



Adriana Clotilde da Costa

Licenciada em Engenharia Biomédica

Otimização da técnica de micro Fluorescência de Raios- X para o estudo de ossos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientador: Mauro Guerra, Doutor, FCT/UNL
Micaela Fonseca, Doutora, FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Carla Maria Quintão Pereira, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Vogais: Doutor Mauro António Moreira Guerra, Doutoramento em Física pela Universidade Nova de Lisboa

Doutor Jorge Miguel de Brito Almeida Sampaio, Investigador da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Novembro, 2015

Otimização da técnica de micro Fluorescência de Raios- X para o estudo de ossos

Copyright © Adriana Clotilde da Costa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“A ciência não é só compatível com a espiritualidade; é uma profunda fonte de espiritualidade “ Carl Sagan

Agradecimentos

Esta dissertação não é apenas resultado de um empenho individual, mas sim de um conjunto de esforços que o tornaram possível e sem os quais teria sido muito mais difícil chegar ao fim desta etapa, que representa um importante marco na minha vida pessoal e profissional. Agradecimentos são devidos a várias pessoas e instituições que me apoiaram e colaboraram comigo nesta dissertação.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, porque me deu a oportunidade de concretizar este projeto.

Aos meus orientadores, Doutor Mauro Guerra e Doutora Micaela Fonseca, pela forma como me motivaram a realizar este projeto, pela forma como me indicaram a melhor maneira de realizar e escrever esta dissertação, pelo empenho, pelo entusiasmo com que me explicaram tudo o que consideravam importante e por se mostrarem sempre disponíveis para me ajudar em qualquer assunto relacionado com a dissertação. Por me fazerem crescer a nível pessoal e profissional ao longo deste tempo que passámos juntos e por nunca terem perdido a dedicação a esta dissertação.

Ao IST/CTN, a todos os colaboradores que permitiram que fosse possível fazer este estudo e que sempre se mostraram disponíveis para ajudar.

Ao diretor do departamento de Física, professor José Paulo Santos, que sempre se interessou pelos resultados desta dissertação e que me motivou para que conseguisse finalizar o projeto sem nunca perder a motivação.

À coordenadora do curso de Engenharia Biomédica, professora Carla Quintão, por responder a todas as questões relacionadas com a dissertação e à sua escrita e por ter sempre entusiasmo em todos os projetos apresentados que mostrem viabilidade.

À mestra Cátia Santos pela colaboração e pela partilha de conhecimentos e de dados para que este estudo fosse possível ser realizado.

A todos os professores e alunos que partilharam comigo o laboratório, em que o espírito de entreajuda e motivação esteve sempre presente do início ao fim deste projeto. Em especial à Alexandra Silva que partilhou comigo muitos momentos e fomos capazes de trabalhar em

grupo de forma a que ambas tivéssemos bons resultados. Não esquecendo ainda da minha companheira de todo o percurso académico, Inês Ramos, em que connosco sempre houve cooperação sem nunca esquecer a amizade em tudo a que nos propusemos.

Ao Dr. Francisco pela disponibilidade que apresentou para qualquer assunto relacionado com esta dissertação e pela bibliografia que me enviou, tornando-se muito útil para a escrita e compreensão das doenças reumáticas.

À minha mãe que me facultou a possibilidade deste percurso académico, que sempre me deu entusiasmo para finalizar este mestrado integrado. Para além de mãe, foi uma amiga, que mesmo à distância conseguiu ter atenção às minhas ansiedades e preocupações ao longo do tempo e que nunca me deixou desistir dos meus objetivos de vida.

Ao meu irmão que sempre se preocupou e se mostrou disponível para ajudar em qualquer assunto que precisasse, que me deu ânimo para finalizar este projeto e iniciar a minha vida profissional.

Aos meus padrinhos que se mostraram atentos ao meu percurso académico e que me motivaram para superar todos os obstáculos sem perder o rumo.

Aos meus amigos, em especial à Joana Costa e Romana Costa que me ouviram, apoiaram sempre e que ajudaram já que, sem elas, não seria possível este resultado.

Ao Miguel Neves que, para além de colega de curso e parceiro de estudo se tornou também um amigo, sempre disponível para colaborar em tudo o que precisasse.

Muito me apraz.

Resumo

Nos países desenvolvidos, as doenças reumáticas são o grupo de doenças mais frequentes da espécie humana, sendo por isso o primeiro motivo de consulta nos cuidados de saúde primários e a principal causa de incapacidade temporária para o trabalho e de reformas antecipadas por doença/invalidez (Canhão & Branco, 2013). O estudo destas doenças torna-se cada vez mais urgente visto que estas têm tendência crescente, tendo em conta os atuais estilos de vida e o aumento da longevidade da população. Nesta dissertação foi estudada e otimizada a técnica de Micro Fluorescência de Raios-X (μ -XRF) de forma a permitir um estudo de elementos maioritários e elementos traço em ossos com doenças reumáticas, tendo em especial atenção a razão Ca/P, já que, por estudos até agora efetuados, esta razão é considerada um biomarcador adequado para a avaliação da saúde dos ossos. Foram então verificados os erros aleatórios e sistemáticos existentes nesta técnica e concluiu-se quais os tipos de parâmetros que devem ser tidos em conta para este estudo, tais como corrente, tensão do tubo, filtros, entre outros. As amostras foram ainda analisadas com a técnica de PIGE (*Particle Induced Gamma-ray Emission*) e comparados os resultados com os de μ -XRF de forma a avaliar a influência da topologia da amostra. Pretende-se que este estudo seja o início do desenvolvimento de um método alternativo de diagnóstico precoce de doenças reumáticas, conduzindo a um tratamento mais eficaz e melhorando assim a qualidade de vida da população.

Palavras-chave: μ -XRF, PIGE, ossos, doenças reumáticas, razão Ca/P

Abstract

In developed countries, rheumatic diseases are the most common diseases group of mankind and is therefore the first reason of consultation in primary care and the leading cause of temporary incapacity for work and early retirement due to illness/disability (Canhão & Branco, 2013). The study of these diseases is becoming increasingly urgent since these have an increasing trend, taking into account the current lifestyles and increased longevity of the population. In this thesis we have performed an optimization of a Micro X-Ray Fluorescence spectrometer (μ -XRF) in order to allow a study of major and trace elements in bones with rheumatic diseases, with particular attention to Ca/P ratio, since that, for studies performed so far, this ratio is considered to be a suitable biomarker for bone health assessment. In this study, the influence of several parameters, such as current, tube voltage, filters, among others, was investigated, in order to reduce uncertainties and increase sensitivity. The samples were also analyzed with the PIGE (*Particle Induced Gamma-ray Emission*) technique and compared to μ -XRF results in order to evaluate the influence of the sample topology. It is intended that this study will then be the beginning of the development of an alternative method for early diagnosis of rheumatic diseases, leading to a more effective treatment and thus improving the quality of life of the population.

Keywords: μ -XRF, PIGE, bones, rheumatic diseases, Ca/P ratio

Conteúdo

INTRODUÇÃO	1
ESTADO DE ARTE	3
1.1.OSSOS E DOENÇAS REUMÁTICAS	3
1.1.1.Doenças reumáticas	5
1.1.1.1.Artrite reumatóide (AR)	6
1.1.1.2.Osteoartrose (OA)	6
1.1.1.3.Osteoporose (OP)	6
1.1.1.4.Patologia periarticular	8
1.2.RAZÃO CA/P	9
A TÉCNICA DE μ-XRF	11
2.1. PRINCÍPIOS FÍSICOS DE μ -XRF	12
2.1.1. Efeito fotoelétrico	13
2.1.2. Efeito de Auger	14
2.1.3. Dispersão de Compton	14
2.1.4. Dispersão de Rayleigh	16
2.2.DETECTOR DE RAIOS-X	17
2.3.NOMENCLATURA UTILIZADA NA ANÁLISE ESPECTRAL	18
2.4.DIFERENTES RISCAS VISÍVEIS NO ESPETRO	19
2.5. ABSORÇÃO DE RAIO-X AO LONGO DA AMOSTRA	19
2.6.EXEMPLO DE ESPETRO DE RAIOS-X PARA O ESTUDO EM OSSOS	21
2.6.1.Quantificação dos espectros	22
2.6.2.Limite mínimo de detecção	23
A TÉCNICA DE PIGE (<i>PARTICLE INDUCED GAMMA-RAY EMISSION</i>)	25
3.1. PRINCÍPIOS FÍSICOS DE PIGE	26
3.1.1. Secção eficaz	26
3.1.1.1.Ressonância de alvo fino	28
3.1.1.2.Ressonância alvo grosso, secção eficaz integrada	28
3.1.2. Poder de paragem	28
3.2. ANÁLISE QUALITATIVA POR PIGE	29
3.3. ANÁLISE QUANTITATIVA POR PIGE (QUANTIFICAÇÃO ELEMENTAR)	31
3.3.1. ERYA (<i>Emitted Radiation Yield Analysis</i>)	31
ANÁLISE DE RESULTADOS	33
4.1.MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1.1. Equipamento de μ -XRF	33

4.1.2. Equipamento de PIGE	34
4.1.2.1. Linha de reações nucleares	35
4.1.2.2. Detetor Ge (HP)	36
4.1.3. Pré-preparação de amostras:	37
4.1.4. Amostras padrão	37
4.2. OTIMIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MICRO XRF PARA ESTUDO DE OSSOS	38
4.2.1. Erros sistemáticos	38
4.2.2. Influência da tensão do tubo	40
4.2.3. Influência da corrente	41
4.2.3. Otimização dos filtros para análise em ossos	43
4.2.5. Fatores geométricos	47
4.2.5.1. Análise por PIGE	52
4.2.5.2. Análise por μ -XRF	53
4.2.5.3. Comparação de resultados das técnicas de μ -XRF e PIGE	54
4.2.6. Inhomogeneidades naturais da amostra	56
CONCLUSÃO	59
BIBLIOGRAFIA	61
ANEXOS	65
ANEXO 1 : ESQUEMA DE TRANSIÇÕES DA CAMADA K	66
ANEXO 2: ESQUEMA DE TRANSIÇÕES DA CAMADA L	67
ANEXO 3. DIAGRAMA DOS ESTADOS EXCITADOS DO ^{31}P	68
ANEXO 4: GRÁFICOS DE AMOSTRAS DE OSSO CONTROLO, COM OSTEOPOROSE E BONE ASH	69
ANEXO 5: POSTER CSI	72
ANEXO 6: MAPEAMENTOS	73

Lista de Tabelas

Tabela 1. Doenças reumáticas mais comuns em Portugal	5
Tabela 2. Valores de razão Ca/P obtidos por Zhang et al. 2005.....	10
Tabela 3. Atenuação para os diferentes filtros de Al, com diferentes espessuras	20
Tabela 4. Limite de deteção calculado para cada elemento existente em cada amostra padrão ($\mu\text{g/g}$)	40
Tabela 5. Tempo morto associado ao aumento de corrente, sem filtros	41
Tabela 6. Tempo morto associado ao aumento de corrente, com filtros	42
Tabela 7. Valores de concentração ($\mu\text{g/g}$) dos padrões de osso para diferentes filtros.....	44
Tabela 8. Valores de coeficiente mássico de atenuação linear (μ/ρ) para os diferentes constituintes do osso trabecular para 2 keV	51
Tabela 9. Valores do coeficiente mássico de atenuação linear (μ/ρ) para os diferentes constituintes do osso trabecular para 4 keV	51
Tabela 10. Valores da atenuação no osso para diferentes espessuras com energia de 2 keV..	52
Tabela 11. Valores da atenuação no osso para diferentes espessuras com energia de 4 keV..	52
Tabela 12. Razões Ca/P para as diferentes amostras encontradas na bibliografia	55
Tabela 13. Razões Ca/P para as diferentes amostras obtidas por XRF e PIGE	55
Tabela 14. Valores de concentração dos elementos constituintes das amostras padrão ($\mu\text{g/g}$)..	57
Tabela 15. Comparação da razão Ca/P certificada com as razões obtidas através da medição com áreas e com pontos	58

Lista de Figuras

Figura 1. Características interiores de uma porção da diáfise de osso adulto	3
Figura 2. Secção transversal de uma trabécula.....	4
Figura 3. Fotografia em microscopia ótica de osso normal (imagem do lado esquerdo) comparado com osso com osteoporose (imagem do lado direito). Fonte: (Seeley, Stephens, & Tatr, Capítulo 6: Sistema esquelético, ossos e tecido ósseo, 2005)	7
Figura 4. Tubo de raios-X. Fonte: http://edxrf.if.usp.br/index.php/EDXRF/OEpsilon5	12
Figura 5. Esquema do efeito fotoelétrico	13
Figura 6. Esquema do efeito de Auger	14
Figura 7. Esquema do dispersão de Compton	15
Figura 8. Esquema da dispersão de Rayleigh	16
Figura 9. Espectro primário à saída do tubo de raios-X com um ânodo de Ródio.....	17
Figura 10. Feixe de fótons incidentes na amostra e sua detecção. Fonte: http://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elementar-analysis/micro-xrf-and-txrf/m4-tornado/technical-details/spot-size.html	17
Figura 11. Espectro de padrão “bone ash”, 100 uA, 50 kV sem filtro.....	21
Figura 12. Reta de calibração para P	22
Figura 13. Gráfico da eficiência do detetor utilizado. Fonte: http://www.amptek.com/wp-content/uploads/2013/12/sdd_15.png	23
Figura 14. Secção eficaz da reação $^{23}\text{Na}(p,p',\gamma)^{23}\text{Na}$ (Fonseca, 2010)	27
Figura 15. Espectro de osso por PIGE	29
Figura 16. Diagrama dos primeiros níveis de excitação de ^{31}P (P.M.Endt, C.M.Braams .1957)	30
Figura 17. Equipamento de μ -XRF. Fonte: http://www.microscopy.info/Content/Press/659.jpg	33
Figura 18. Representação esquemática do acelerador TANDEM (Fonseca, 2010)	34
Figura 19. Linha de reações nucleares do Tandem (Fonseca, 2010)	35
Figura 20. Amostras de osso de controlo.....	37
Figura 21. Pastilhas de amostras padrão utilizadas.....	38
Figura 22. Gráfico de contagens por energia do padrão “bone ash” a diferentes tensões	40
Figura 23. Gráfico de contagens por energia do padrão “bone ash” a diferentes correntes, sem filtros	41
Figura 24. Gráfico de contagens por energia do padrão “bone ash” a diferentes correntes, com filtros	42
Figura 25. Gráfico do padrão “bone ash” com os vários filtros	45
Figura 26. Representação esquemática da atenuação de um feixe de raios-X numa amostra de osso trabecular	47

Figura 27. Imagem microscópica de osso trabecular (amostra controlo)	48
Figura 28. Imagem microscópica da amostra controlo com medição da espessura das trabéculas	49
Figura 29. Imagem microscópica da amostra controlo com medição do tamanho de uma trabécula.....	50
Figura 30. Comparação da Razão Ca/P para as diferentes amostras utilizando XRF e PIGE ...	54
Figura 31. Mapeamento Fe, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone.....	58
Figura 32. Esquema de transições da camada K.....	66
Figura 33. Esquema de transições da camada L	67
Figura 34. Diagrama completo dos estados excitados de ^{31}P (P.M.Endt, C.M.Braams .1957).....	68
Figura 35. Gráficos da razão Ca/P ao longo dos pontos analisados para amostra controlo, a uma tensão de 50 kV, com os diferentes filtros	69
Figura 36. Gráficos da razão Ca/P ao longo dos pontos analisados para amostra de osso com osteoporose, a uma tensão de 50 kV, com os diferentes filtros	70
Figura 37. Gráficos da razão Ca/P ao longo dos pontos analisados para amostra padrão bone ash, a uma tensão de 50 kV, com os diferentes filtros.....	71
Figura 38. Poster apresentado no Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX (CSI 2015), Figueira da Foz, entre 30 de agosto a 3 de setembro	72
Figura 39. Mapeamento de K das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone	73
Figura 40. Mapeamento de Mn das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone.....	73
Figura 41. Mapeamento de P das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone	73
Figura 42. Mapeamento de Pb das amostras padrão da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone.....	74
Figura 43. Mapeamento de Zn das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone.....	74
Figura 44. Mapeamento de Ca das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone.....	74

Lista de Símbolos

Z – número atômico

A – número de massa

Ca – cálcio

P – fósforo

Pb – chumbo

Fe – ferro

Mn – manganês

K – potássio

Zn – zinco

Sr – estrôncio

Zr – zircônio

Rh - ródio

Al –alumínio

Ti – titânio

Cu – cobre

Na – sódio

Mg – magnésio

Cr – crômio

Ni – níquel

Sn – estanho

Co – cobalto

Br – bromo

Se – selênio

O – oxigênio

Li – lítio

B – boro

F –flúor

Be – berílio

Ta – tântalo

Ba –bário

λ - comprimento de onda

h – constante de Planck

c – velocidade da luz

n – número quântico principal

l – número quântico angular

j – número quântico total

ε – eficiência do detetor

σ – secção eficaz

S –poder de paragem

μ_0 - coeficiente de atenuação linear

μ/ρ – coeficiente mássico de atenuação linear

Y_γ^e - rendimento da radiação gama

Lista de Acrónimos

μ -XRF- micro X-ray fluorescence

IST/CTN – Instituto Superior Técnico/Centro Tecnológico Nuclear

FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia

PIGE – Proton Induced Gama Ray Emission

AR – artrite reumatoide

OA - osteoartrose

OP - osteoporose

OPPM – osteoporose pós-menopáusica

DMO – densidade mineral óssea

DEXA - Dual Energy X-ray Absorptiometry

ICP – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

XPS – X-ray Photoelectron Spectroscopy

IUPAC – International Union of Pure Applied Chemistry

FWHM – Full Width at Half Maximum

ERYA – Emitted Radiation Yield Analysis

NIST – National Institute of Standards and Technology

Introdução

Nesta dissertação pretende-se fazer uma otimização da técnica de μ -XRF (*micro X-Ray Fluorescence*) para a análise espectral de elementos maioritários e elementos traço em ossos humanos com doenças reumáticas.

O estudo de doenças reumáticas torna-se cada vez mais urgente, visto que estas têm forte influência na população portuguesa, revelando-se uma das principais causas de acesso aos cuidados de saúde e levando mesmo a reformas antecipadas por invalidez (Canhão & Branco, 2013). Assim, nesta dissertação pretende-se fazer um estudo elementar de ossos com estas patologias e espera-se que seja um potenciador de outros projetos que conduzam a um diagnóstico precoce destas patologias, levando a uma melhoria das condições de vida da população.

Desta forma, foram avaliados os elementos maioritários e elementos traço em ossos com doenças reumáticas, tais como osteoporose, comparando com ossos sãos, de forma a analisar o défice ou abundância destes elementos em regiões próximas das trabéculas. Foi ainda analisada a razão Ca/P nas mesmas amostras de osso, averiguando acerca da sua relevância como biomarcador.

Para tal, otimizaram-se parâmetros da técnica de μ -XRF que é cada vez mais utilizada neste tipo de estudo de quantificação de elementos maioritários e elementos traço, analisando elementos com número atómico superior a 11. As vantagens desta técnica prendem-se com o facto de ser um método não destrutivo, não exige pré-preparação da amostra, apresenta alta sensibilidade e velocidade para obtenção de dados analíticos, permite uma interpretação simples da análise qualitativa e quantitativa dos espectros e apresenta dispositivos portáteis (N.Carmona, Ortega-Feliu, Gómez-Tubío, & Villegas, 2010). O equipamento utilizado foi o M4 Tornado™ Bruker, Alemanha, existente no laboratório de Física Atómica e Molecular na FCT/UNL.

Pretendia-se então definir os melhores parâmetros desta técnica, ajustados para este estudo em ossos. Assim, foi otimizada a tensão do tubo, corrente e escolha do melhor filtro a utilizar no equipamento consoante o tipo de análise que se pretende realizar. A nível da amostra, foi verificada a influência da rugosidade existente numa amostra de osso trabecular a nível de resultados da razão Ca/P. A esta topologia existente no osso trabecular, decidimos chamar fatores geométricos. Previa-se que devido a estas rugosidades, o feixe fosse atenuado ao longo da amostra, levando a um resultado menos preciso da razão Ca/P. Para tal, foram comparadas estas amostras com amostras pastilhadas de osso humano produzidas no laboratório, já que estas não apresentam este tipo de características topológicas a olho nu. Ainda para este estudo, foi ainda utilizada uma técnica complementar, chamada PIGE (*Particle Induced Gamma-ray Emission*). Esta técnica permite uma quantificação de

elementos leves, ou seja, elementos com número atómico inferior a 14. Como se trata de uma emissão de radiação gama, previa-se que os fatores geométricos não influenciassem os resultados da razão Ca/P, já que a atenuação ao longo da amostra, por esta radiação, considera-se desprezável. Este estudo foi realizado no acelerador Tandem com energia de 3 MeV existente no IST/CTN em Lisboa, Portugal.

Ao longo desta investigação, constatou-se que poderiam ainda existir inomogeneidades a nível da disseminação de elementos nas amostras pastilhadas. Portanto, decidiu-se analisar estas amostras com μ -XRF realizando 30 pontos por amostra e posteriormente o mesmo ensaio mas desta vez dividindo a amostra em 4 áreas e compararam-se os resultados. A este fenómeno decidimos chamar de inomogeneidades naturais da amostra.

Este projeto é de extrema importância dada a gravidade das doenças reumáticas e a sua incidência na população portuguesa. Pretende-se então, obter um estudo acerca da composição elementar de ossos com estas patologias podendo incentivar a que, no futuro, seja encontrada uma nova forma de auxílio ao diagnóstico médico, já que o diagnóstico precoce é fundamental para um tratamento adequado. A enfatização da necessidade deste tipo de estudos é realçada em vários artigos tais como no estudo da osteoporose e elementos traço por Jan Aaseth que recomendam uma caracterização da estrutura mineral e elementos traço para o estudo da prevenção e tratamento de doenças reumáticas como a osteoporose (Aaseth, Boivin, and Andersen 2012).

Esta dissertação está dividida em 4 capítulos e conclusão:

No capítulo 1 será abordada a importância deste estudo e a contextualização acerca das doenças ósseas mais comuns em Portugal.

No capítulo 2 é dada uma explicação da técnica de μ -XRF, juntamente com algumas noções de fenómenos físicos que acontecem para que seja compreendida a análise espectral associada a esta técnica. Além disso também é analisado um espectro de raios-X de uma amostra de osso, conduzindo a um melhor entendimento desta investigação.

No capítulo 3 encontra-se um breve estado de arte da técnica PIGE em conjunto com os princípios físicos associados e ainda, um exemplo de um espectro de osso obtido utilizando esta técnica. Por fim encontra-se também uma explicação dos métodos de quantificação qualitativa e quantitativa em que para este último se faz referência ao programa ERYA, utilizado neste estudo.

No capítulo 4 apresentam-se os resultados obtidos da otimização da técnica de μ -XRF consoante os parâmetros que já foram explicados anteriormente e são analisados estes resultados.

Por fim encontram-se as conclusões desta dissertação e alguns trabalhos que poderão ser feitos no futuro.

Estado de Arte

1.1.Ossos e doenças reumáticas

Os ossos são o material de construção do esqueleto e proporcionam uma armação rígida para os músculos. O osso é composto por matéria orgânica, inorgânica e água. A matriz orgânica é principalmente constituída por colagénio. Apresenta na sua constituição inorgânica elementos maioritários (Ca, P, K e Na) e elementos traço (Mg, Cr, Zn, Ni, Cu, Sn, Pb, Zi, Co, Br, Se, Sr, Mn, Fe, entre outros) classificados desta forma de acordo com a sua abundância (Zhang et al. 2005).

Os ossos, em conjunto com as articulações e músculos formam o aparelho locomotor. Para a análise do osso, considera-se subdividido em três componentes: epífise, diáfise e placa epifisária. As epífises, ou extremidades do osso, são compostas principalmente por osso esponjoso, constituído por pequenos espaços ou cavidades rodeados por matriz óssea. A superfície exterior da epífise é composta por uma camada de osso compacto que, nas articulações é recoberto por cartilagem articular.

A diáfise, ou corpo do osso, é composta por osso compacto, na sua maior parte constituído por matriz óssea que rodeia alguns pequenos espaços. A placa epifisária ou de crescimento, é constituída por cartilagem hialina, e situa-se entre a epífise e a diáfise. O crescimento ósseo em comprimento ocorre na placa epifisária e, quando para, a placa epifisária passa a denominar-se linha epifisária.

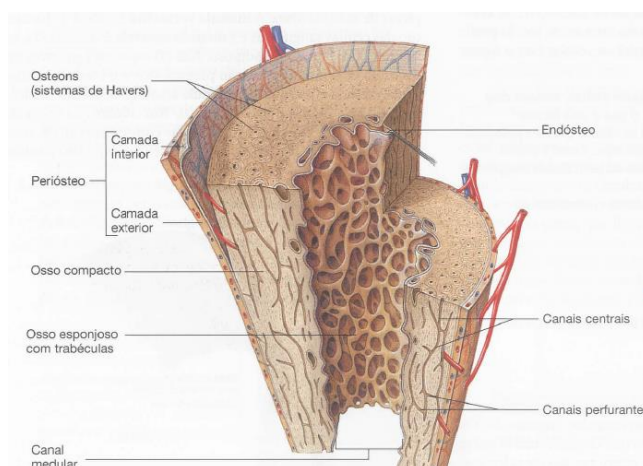


Figura 1. Características interiores de uma porção da diáfise de osso adulto

O osso esponjoso é constituído por bastonetes ou placas ósseas interligadas denominadas trabéculas (do latim trave). Entre as trabéculas existem espaços que, no osso vivo, são preenchidos por medula óssea e vasos sanguíneos (ver figura 1). A maioria das trabéculas é fina (50-400 μm) e constituída por lamelas, dispondo-se os seus osteócitos (osteoblastos maduros, rodeados por matriz óssea) entre estas. Cada osteócito está associado a outros osteócitos através dos canalículos (pequenos canais). As superfícies das trabéculas são revestidas por uma camada única de células, que consiste principalmente em osteoblastos (células responsáveis pela formação do osso) e alguns osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção ou destruição do osso).

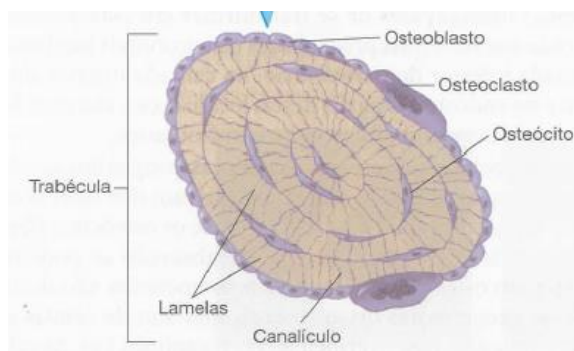


Figura 2. Seção transversal de uma trabécula

O osso compacto é mais denso e possui menos espaços do que o osso esponjoso. Os vasos sanguíneos penetram na própria substância óssea, e os osteócitos e as lamelas do osso compacto vão orientar-se predominantemente em torno desses vasos sanguíneos. As superfícies exteriores do osso compacto são formadas por lamelas circunferenciais, que são placas achatadas que se dispõem em redor do osso.

A massa óssea atinge o seu máximo por volta dos 30 anos sendo que os homens têm geralmente ossos mais densos do que as mulheres por causa dos efeitos da testosterona e do seu maior peso corporal. Após os 35 anos, tanto os homens como as mulheres têm uma perda óssea relacionada com a idade (Seeley, Stephens, & Tatr, Capítulo 6: Sistema esquelético, ossos e tecido ósseo, 2005).

O osso esponjoso é o que se perde primeiro, à medida que as trabéculas se tornam mais finas e frágeis. A capacidade que as trabéculas têm de proporcionar suporte, também diminui à medida que perdem contacto umas com as outras. Finalmente, algumas trabéculas desaparecem totalmente.

Por volta dos 40 anos, começa a haver perda lenta de osso compacto e acentua-se após os 45. No entanto, a taxa de perda do osso compacto é cerca de metade da taxa de perda do osso esponjoso (Seeley, Stephens, & Tatr, Capítulo 6: Sistema esquelético, ossos e tecido ósseo, 2005).

1.1.1. Doenças reumáticas

As doenças reumáticas são enfermidades e alterações funcionais do sistema musculoesquelético de causa não traumática e incluem doenças inflamatórias (do sistema musculoesquelético, do tecido conjuntivo e dos vasos), doenças degenerativas (das articulações periféricas e da coluna vertebral), doenças metabólicas (ósseas e articulares), alterações dos tecidos moles peri articulares e doenças de outros órgãos e/ou sistemas relacionados com as anteriores. Estas constituem, nos países desenvolvidos, o grupo de doenças mais frequentes da espécie humana e como tal, são o primeiro motivo de consulta nos cuidados de saúde primários, como também são a principal causa de incapacidade temporária para o trabalho e de reformas antecipadas por doença/invalidez (Canhão & Branco, 2013).

O estudo destas doenças torna-se cada vez mais premente, visto que, estas têm tendência crescente, tendo em conta os atuais estilos de vida e o aumento da longevidade da população. Segundo o estudo do EpiReumaPt realizado de 2011 a 2013, para o qual foram recrutados 10.661 portugueses, as doenças reumáticas mais comuns em Portugal são: (Census R. , 2011-2013)

Tabela 1. Doenças reumáticas mais comuns em Portugal

	Prevalência geral*	Prevalência mulheres*	Prevalência homens*
Lombalgia	26,40%	29,60%	22,80%
Fibromialgia	1,70%	3,10%	0,10%
Osteoartrose do joelho	12,40%	15,80%	8,60%
Osteoartrose da mão	8,70%	13,80%	3,20%
Osteoartrose de anca	2,90%	3,00%	2,90%
Osteoporose	10,20%	17,00%	2,60%
Patologia Periarticular	15,80%	19,10%	12,00%
Artrite reumatoide	0,70%	1,10%	0,30%
Espondilartrites	1,60%	2,00%	1,20%
Lúpus eritematoso sistémico	0,10%	0,20%	0,04%
Polimialgia Reumática	0,10%	0,10%	0,06%
Gota	1,30%	0,08%	2,60%

***Para o cálculo das prevalências foi elaborado um ponderador de acordo com o desenho do estudo, dimensão populacional e idade. O ponderador foi desenvolvido pela Nova School of Statistics and Information Management (ISECI/UNL)**

1.1.1.1.Artrite reumatóide (AR)

A AR é uma doença inflamatória crónica, que apresenta como manifestação principal o envolvimento das articulações e das estruturas periarticulares, podendo, contudo, afectar o tecido conjuntivo em qualquer parte do organismo e originar as mais variadas manifestações sistémicas. O diagnóstico precoce é fundamental, pois a AR diagnosticada na fase inicial e correctamente tratada tem muito melhor prognóstico (Ramos, 2013).

1.1.1.2.Osteoartrose (OA)

A OA caracteriza-se por um padrão reactivo e dinâmico, relacionado com a idade, que surge em resposta a lesão ou dano articular e engloba o processo de lesão inicial e a sua tentativa de reparação. A definição de OA inclui a perda focal de cartilagem articular, aumento da actividade óssea subcondral, crescimento ósseo marginal (osteófitos), remodelação, alteração da superfície articular, instabilidade ligamentar e atrofia muscular periarticular e, em alguns casos, distensão sinovial e inflamação (Capela, 2013). Observa-se que para OA há um aumento da acumulação de elementos (Ca, P, K, S e Zn) no complexo osso-cartilagem. Este aprimoramento da distribuição elementar pode sugerir um aumento da actividade de enzimas degradativas da cartilagem indicado através da maior concentração destes elementos (Kaabar et al. 2008).

1.1.1.3.Osteoporose (OP)

A definição de osteoporose foi criada durante o primeiro Conselho Internacional de Osteoporose em 1991 e rectificada no encontro seguinte, como sendo uma doença óssea sistémica caracterizada por baixa massa óssea e deterioração da microarquitECTURA do osso, resultando num aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade a fraturas. Ossos longos, como o fémur tornam-se mais frágeis e passíveis a fraturas. A OP é classificada em dois tipos:

- primária (pós-menopáusica-OPPM e associada ao envelhecimento)

- secundária (associada a uma doença, perturbação alimentar, ou medicação-p.e.glicocorticóides). A OP pode surgir por um defeito na formação óssea, ou por um desequilíbrio entre a concentração de osteoblastos e osteoclastos. No fim da adolescência o crescimento linear chega ao fim. No entanto, o osso continua a ser remodelado e, com o envelhecimento, a formação óssea tende a não compensar a reabsorção (Rodrigues, 2013). Na OPPM, o desequilíbrio entre a formação e a reabsorção do osso, é induzido pela deficiência de estrogénio ocorrendo uma rápida perda de massa óssea nos primeiros anos de défice hormonal. No caso da OP associada ao envelhecimento, este desequilíbrio é

causado pela deficiência de Ca e vitamina D (que interfere na absorção de Ca e P e assim, na mineralização da matriz óssea).

O balanço ósseo é obtido entre o pico de massa óssea e o grau de perda óssea ocorrido. Quando este é negativo, induz uma perda de massa óssea com redução da espessura cortical e diminuição da espessura da conectividade das trabéculas do osso esponjoso. Por outro lado, o osso mais antigo acumula microdanos que não são reparados, enquanto que o osso mais superficial é substituído por um osso jovem, pouco mineralizado. O resultado de todas estas alterações é a redução da resistência, a incapacidade de absorver energia com impactos mínimos e a fratura. Segue-se na figura 3 comparação entre um osso saudável e um osso com osteoporose, verificando-se uma clara diferença entre estes pela falta de massa óssea no osso osteoporótico.



Figura 3. Fotografia em microscopia ótica de osso normal (imagem do lado esquerdo) comparado com osso com osteoporose (imagem do lado direito). Fonte: (Seeley, Stephens, & Tatr, Capítulo 6: Sistema esquelético, ossos e tecido ósseo, 2005)

A ocorrência da osteoporose aumenta com a idade, tendo maior incidência em mulheres do que em homens como se pode confirmar na tabela 1, em que nas mulheres tem prevalência de 17% e nos homens de 2.6%. Os tratamentos para a osteoporose são concebidos para reduzir a perda óssea e/ou aumentar a formação do osso (Seeley, Stephens, & Tatr, Capítulo 6: Sistema esquelético, ossos e tecido ósseo, 2005).

O estudo da OP, nos últimos anos, tem aumentado o interesse da comunidade científica e da população em geral já que é uma patologia com grande incidência a nível mundial. A quantificação do conteúdo mineral do osso, permite a criação de métodos de diagnósticos da OP antes da ocorrência de fraturas.

A baixa ingestão de Ca na infância e adolescência leva a um baixo desenvolvimento da massa óssea, podendo ser considerado como um dos motivos primários para a ocorrência de OP anos mais tarde. O osso contém cerca de 99% de todo o cálcio existente no organismo. Quando os níveis de Ca no sangue diminuem, é activado o processo de reabsorção de forma a aumentar os níveis de Ca (Clemente and Neto 2002).

Verifica-se que em pacientes com OP, os níveis de elementos maioritários (Ca, P e K) e elementos traço (Fe, Zn e Sr) estão diminuídos quando comparados com indivíduos sem patologias associadas. Esta diminuição é mais acentuada no osso esponjoso e na cartilagem (Zhang et al. 2005).

O diagnóstico da OP dá-se pela avaliação da densidade mineral óssea (DMO) em que esta se encontra reduzida nesta patologia ou quando ocorrem fraturas. A técnica de diagnóstico mais utilizada em OP é a medição da massa óssea por absorciometria de dupla energia radiológica (DEXA) mas também pode ser feita através tomografia computadorizada quantitativa, ultrasonografia quantitativa e absorciometria radiográfica. (Imboden, Stone, and Hellmann 2011). No entanto, estas técnicas não fornecem informações sobre a distribuição elementar ao longo do osso ou da sua composição. O desenvolvimento de técnicas como a fluorescência com microfeixe de raios-X pode contribuir para a avaliação da condição óssea, avaliando as distribuições e conteúdo do osso, ao nível microscópico.

O tratamento da OP consiste em três etapas: modificação do estilo de vida (prática de exercício físico, aumento da ingestão de Ca e vitamina D, parar de fumar e ingerir álcool), intervenções nutricionais (suplementação de Ca e vitamina D) e tratamentos farmacológicos (biofosfanatos, calcitonina, hormona paratiroide) (Imboden, Stone, and Hellmann 2011).

Alguns investigadores relataram que a administração de Sr na terapia de OP combinada com a administração de Ca permite uma maior eficácia no tratamento já que o armazenamento de Sr não causa perda de Ca e quando a concentração de Ca diminui até um nível crítico, Sr irá fornecer mineralização rápida (P. Bratter 1983).

1.1.1.4. Patologia periarticular

A patologia periarticular ou dos tecidos moles está associada ao sistema locomotor. Resulta de alterações estruturais localizadas nas partes moles que originam dor ou impotência funcional, em oposição às patologias mais difusas ou sem alterações estruturais objetiváveis, tal como os síndromes dolorosos regionais ou a fibromialgia. Esta patologia tem como etiologia processos de microtraumatismo de repetição, crónicos, muitas vezes relacionados com a atividade profissional ou atividades de lazer (desporto não competitivo). As artropatias inflamatórias podem também manifestar-se não apenas como inflamação articular mas também periarticular (Pereira, 2013).

Dada a prevalência e importâncias de doenças reumáticas, o seu estudo é fundamental. Verifica-se que, para estas doenças, não são conhecidos fatores ambientais, alimentares, ou outros fatores para além de genéticos ou lesões, que as provoquem. Para além disso, para algumas doenças como a doença de Paget ainda não são conhecidas na totalidade

as causas da mesma, existindo ainda alguma discussão aberta sobre as mesmas na comunidade científica. Assim, este estudo ao analisar a concentração de elementos majoritários e traço em ossos na região trabecular utilizando duas técnicas, permite comparar resultados e otimizar a nível de μ -XRF permitindo que novos estudos surjam com maior rigor.

1.2.Razão Ca/P

O osso humano é essencialmente um material compósito constituído por uma fase orgânica, uma fase inorgânica e células, formando o tecido natural. A matéria extracelular envolve as células específicas do tecido numa matriz altamente complexa composta por outros dois componentes, uma fase não mineralizada e uma fase mineralizada (hidroxiapatite). Os cristais de hidroxiapatite representam cerca de 65%-70% da matriz total, sendo estes responsáveis pelo suporte estrutural do osso (Maria G. Raucci).

A estrutura de Ca/P na fase sólida em osso foi primeiramente identificada por deJong em 1926 através de análises químicas e com maior ênfase por difração de raios-X como um fosfato de cálcio cristalino similar a apatite geológica (WF, 1926) .

Mais tarde foi encontrada na sua constituição cristais de carbonato e iões HPO_4 . Hoje em dia considera-se o osso sob a forma de hidroxiapatite com carbono ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) contendo um número de impurezas de HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , Mg^{2+} , Na^+ , F^- e citratos, que são adsorvidos na superfície do cristal e/ou substituídos na estrutura cristalina por Ca^{2+} , PO_4^{3-} e iões OH^- enquanto que os citratos estabilizam a estrutura nano cristalina de apatite. Assim, devido à presença destes iões, há um aumento da solubilidade garantindo a reabsorção óssea.

Os principais elementos da matriz óssea são Ca e P e as suas concentrações variam independentemente. O teor relativo de Ca-P é fundamental para a manutenção da homeostase mineral e metabolismo ósseo e a sua co-dependência é evidente para o crescimento e desenvolvimento ósseo. Assim, considera-se um biomarcador adequado para a avaliação da saúde dos ossos (Nikolaos Kourkoulis, 2012).

A razão Ca/P pode ser obtida através do valor estequiométrico da hidroxiapatite da seguinte forma:

$$\frac{\text{Número de átomos de Ca} * \text{Massa atómica de Ca}}{\text{Número de átomos de P} * \text{Massa atómica de P}} \quad (1.1)$$

Obtendo-se então o valor aproximado de 2.15. A análise desta razão Ca/P pode ser feita *in vivo* sendo uma avaliação não invasiva e *in vitro*. Neste caso, o estudo pode ser feito com maior rigor visto que é removida a gordura, colagénio e medula. A análise *in vitro*, actualmente é feita utilizando variadas técnicas tais como difração de raios-X, activação de neutrões, ICP-OES (*inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*), NMR (*nu-*

clear magnetic resonance), dispersão de raios-X para pequenos ângulos, fluorescência de raios-X, XPS (*X-ray photoelectron spectroscopy*), entre outras (Nikolaos Kourkouvelis, 2012).

Para ossos com osteoporose, vários investigadores chegaram aos seguintes valores da razão Ca/P:

Tabela 2. Valores de razão Ca/P obtidos por Zhang et al. 2005

	Amostra saudável	Amostra com OP
Osso Compacto	2.09	1.97
Osso Trabecular	2.17	1.96

O valor de controlo está em conformidade com o valor teórico (2.15) e os valores de Ca/P para osteoporose são inferiores ao valor da amostra de osso de controlo. Uma possível explicação para este facto é que no osso osteoporótico a diminuição da concentração de Ca é muito superior à diminuição da concentração de P, daí resultar numa razão Ca/P inferior ao osso de controlo, sem patologias associadas.

A técnica de μ -XRF

Até ao fim de 1980, a microanálise de elementos baseando-se na emissão de raios-X característicos estava estritamente restrita para técnicas com feixes de partículas carregadas (elétrões, prótons e núcleos pesados). No início dos anos 80, a disponibilidade de feixes de radiação altamente intensos a partir de fontes de sincrotrão, aumentou o interesse na utilização de feixes microscópicos de raios-X para a realização de experiências de microfluorescência de raios-X (μ -XRF) para análise de elementos com $Z > 11$. A primeira configuração de um equipamento de microfios de raios-X foi descrita por Horowitz e Howell (1972). Os equipamentos de μ -XRF desenvolveram-se rapidamente nestes últimos anos e o número de aplicações está em crescimento. Hoje em dia, este instrumento é utilizado em controlo de qualidade industrial, pesquisa ambiental, forense e biomédica (Grieken & Markowicz, 2002).

Esta técnica tem vantagens sobre outros métodos visto que apresenta as seguintes características: (N.Carmona, Ortega-Feliu, Gómez-Tubío, & Villegas, 2010)

- É um método não destrutivo;
- Não requer pré-preparação ou manipulação da amostra;
- Alta sensibilidade e velocidade para obtenção de dados analíticos;
- Permite uma interpretação simples da análise qualitativa e quantitativa dos espectros;
- Apresenta configurações portáteis;
- Permite a determinação da composição elementar da amostra.

O uso da microfluorescência de raios-X envolve deteção de fotões de alta energia emitidos a partir de átomos na amostra. A energia de cada fotão é característica dos elementos específicos que constituem a amostra ou de processos de dispersão.

O número de raios-X detetados com as energias características é indicativo, juntamente com outros parâmetros, da concentração do mesmo na amostra.

2.1. Princípios físicos de μ -XRF

O tubo de raio-X é constituído por um tubo de vácuo, um cátodo (composto por um filamento de tungsténio aquecido), um ânodo metálico e uma janela de berílio por onde é emitida a radiação eletromagnética. Na imagem abaixo está uma representação esquemática do tubo de raios-X:

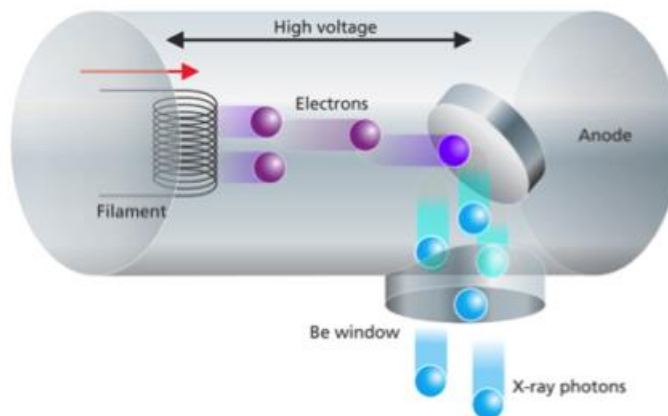


Figura 4. Tubo de raios-X. Fonte:
<http://edxrf.if.usp.br/index.php/EDXRF/OEpsilon5>

Quando é aplicada uma diferença de potencial entre o cátodo e o ânodo, é criado um campo elétrico que acelera os eletrões. Estes, quando interagem com o ânodo podem dar origem a três efeitos:

1. Um eletrão entra no campo elétrico de uma orbital atômica e é desacelerado, em que a perda de energia durante este abrandamento é emitida como radiação eletromagnética chamada radiação de travagem ou Bremsstrahlung dando origem ao espectro contínuo;
2. Os eletrões podem ainda ionizar os elementos do ânodo.

Ao interagirem com os eletrões atômicos das camadas internas e por ionização destas camadas, num processo análogo ao efeito fotoelétrico, serão emitidos fotões quando o átomo regressa ao estado fundamental.

Quando o feixe de fotões incide sobre a amostra a analisar, irá ionizar os átomos existentes e poderão ocorrer vários efeitos: efeito fotoelétrico, efeito de Auger, dispersão de Compton e dispersão de Rayleigh.

Cada átomo tem uma estrutura electrónica diferente, e consequentemente, as transições nas camadas internas têm energias diferentes. A fluorescência emitida pelos átomos neste processo de desexcitação pode ser medida por dispersão em energia ou por dispersão em comprimento de onda. Neste trabalho vai-se utilizar a dispersão em energia. O método de detecção de raios-X de fluorescência dispersiva em energia, dá origem a um

espectro em que as transições na camada interna podem ser separadas de acordo com as energias libertadas nessas transições, e assim, pode-se avaliar a composição elementar da amostra (M. Guerra *et al.* 2012).

2.1.1. Efeito fotoelétrico

O efeito fotoelétrico ocorre quando um fóton incide num alvo, ejetando elétrons, enquanto que neste caso são elétrons que promovem a ionização e consequente ejeção de elétrons. Apenas o elétron com energia superior à energia necessária para arrancar um elétron de um determinado nível atômico, consegue transferir a sua energia para o elétron que é ejetado. O elétron ao ser arrancado do átomo deixa uma lacuna que será preenchida por um elétron vindo de uma camada superior. Esta transição é acompanhada por emissão de radiação-X, apresentando assim, no espectro, um pico característico de cada transição interna que se sobrepõe ao espectro contínuo. Estas transições estão retratadas na figura 5 abaixo apresentada.

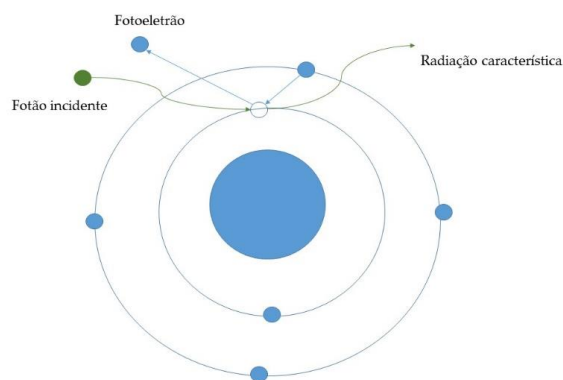


Figura 5. Esquema do efeito fotoelétrico

A energia cinética do elétron ejetado depende da energia do fóton incidente e da energia de ligação do elétron como pode ser compreendida através da seguinte equação:

$$K = h\nu - \omega \quad (2.1)$$

Onde K é a energia cinética do elétron, ω é a energia de ligação, h é a constante de Plank e ν é a frequência da radiação.

A maior probabilidade de interação dá-se quando a energia $h\nu$ do fóton é igual à energia de ligação do elétron. A probabilidade decai com o aumento da energia do fóton.

2.1.2. Efeito de Auger

Foi já afirmado que o excesso de energia que um átomo possui após a remoção de um elétron da camada interna, provoca emissão de radiação característica. Alternativamente, um átomo excitado pode voltar ao seu estado de mais baixa energia, ejetando um dos seus elétrons de um estado menos fortemente ligado, ou seja, a lacuna criada pela excitação do átomo é preenchida por um elétron de um nível mais energético com libertação de energia. Esta energia, em vez de ser libertada sob a forma de fóton, tal como no efeito fotoelétrico, é transferida para outro elétron do mesmo átomo sendo este ejetado. Este fenómeno é chamado efeito de Auger ou excitação auto-ionização e encontra-se retratado na figura 6. A probabilidade deste efeito ocorrer, aumenta com a diminuição da diferença de energia dos estados correspondentes e é maior para elementos com menor Z . Como este efeito não liberta radiação-X (é chamada transição não-radiativa), não é observado diretamente no detetor. Assim, para se poder fazer a análise espectral correta tendo em conta este efeito, utilizam-se valores teóricos de rendimentos de fluorescência que não são mais do que a razão entre a probabilidade de ocorrerem transições radiativas e a soma das probabilidades de transições radiativas e não radiativas.

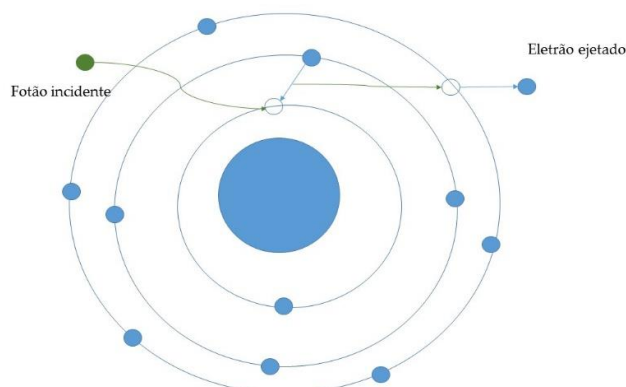


Figura 6. Esquema do efeito de Auger

2.1.3. Dispersão de Compton

Juntamente com os picos característicos explicados anteriormente, observam-se picos correspondentes à dispersão de Compton provocado pela incidência dos fótons X na amostra, havendo então uma colisão inelástica e o fóton é defletido com a correspondente perda de energia que é transmitida ao elétron de uma camada externa do átomo.

Compton observou que ao fazer incidir um feixe de raios-X de comprimento de onda λ sobre elétrons livres em repouso e medindo a intensidade dos raios-X defletidos em função do seu comprimento de onda para vários ângulos de deflexão, verificou que, embora o

feixe incidente consista essencialmente num único comprimento de onda λ , os raios-X deflectidos têm máximos de intensidade em dois comprimentos de onda (um deles é o mesmo comprimento de onda incidente e o outro λ' é maior que λ). O chamado deslocamento de Compton é então dado por: $\Delta\lambda = \lambda' - \lambda$ e varia com o ângulo segundo o qual os raios-X deflectidos são observados.

Já que o fóton incidente transfere parte da sua energia para o eletrão com o qual colide, o fóton defletido apresenta uma energia E' menor e portanto uma frequência mais baixa ($\nu' = E'/h$), o que implica um comprimento de onda maior ($\lambda' = c/\nu'$). Assim, e através das equações relativistas de conservação de energia e momento das partículas, chegou à conclusão que:

$$\Delta\lambda = \lambda_1 - \lambda_0 = \lambda_c (1 - \cos \Theta) \quad (2.2)$$

$$\text{Com } \lambda_c = h/m_0c = 2.43 \times 10^{-12} \text{m} \quad (2.3)$$

Em que λ_c é o comprimento de onda de Compton.

O deslocamento de Compton, $\Delta\lambda$, depende apenas do ângulo de deflexão Θ , e não do comprimento de onda inicial. Este deslocamento para colisões com eletrões fortemente ligados é extremamente pequeno, de modo que o comprimento de onda do fóton defletido permanece praticamente igual (Eisberg and Resnick 1985). Assim, este efeito ocorre predominantemente para elementos mais leves e a sua probabilidade de ocorrer é proporcional a Z (Guimarães 2007). Na figura 7, que se segue, encontra-se um esquema da dispersão de Compton:

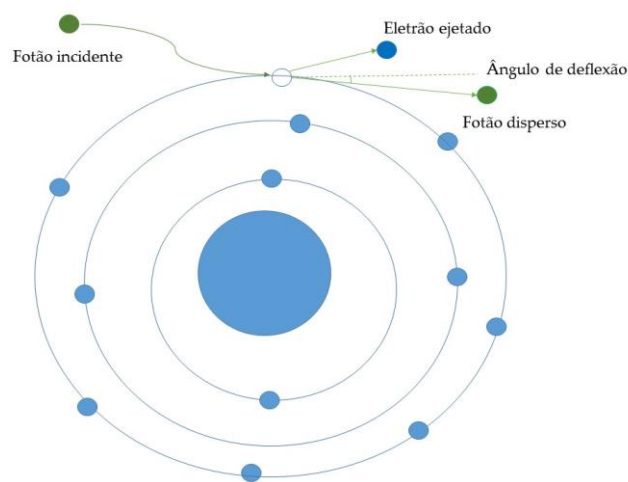


Figura 7. Esquema do dispersão de Compton

2.1.4. Dispersão de Rayleigh

Podem ainda ocorrer colisões elásticas (dispersão de Rayleigh que se encontra retratado na figura 8 abaixo apresentada) essencialmente para elementos pesados, quando a energia de ligação dos eletrões é superior à energia do fotão incidente. O fotão incidente interage com os eletrões do átomo fortemente ligados e é defletido de uma forma elástica mudando apenas a sua direção. Diz-se que o fenómeno é cooperativo já que envolve todos os eletrões do átomo e a sua probabilidade de ocorrência varia com Z^2 (Guimarães 2007).

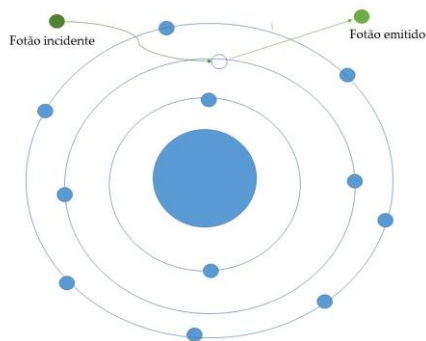


Figura 8. Esquema da dispersão de Rayleigh

Existe ainda outra possibilidade de interação de radiação com a matéria que é denominado de produção de pares. Esta ocorre quando um fotão de alta energia ao passar junto de um núcleo de número atómico elevado com um campo eléctrico intenso, converte a sua energia em matéria gerando um par eletrão-positrão. A energia mínima do fotão para a ocorrência destes fenómenos é igual à soma das energias de repouso das partículas resultantes. Como a energia de repouso para o eletrão e positrão é de 511 keV, a energia mínima do fotão para a ocorrência de produção de pares é de 1022 keV. Como estamos perante energias inferiores, não se verifica este efeito (na técnica de PIGE, onde as energias utilizadas são superiores a 1022 keV, o efeito de produção de pares já ocorre, ver secção 3.2).

A energia máxima de raios -X emitidos a partir de um tubo de raios-X é determinada pela tensão aplicada, como se pode ver na figura 9. A intensidade da radiação é dada em função da corrente do tubo e da existência ou não de filtros.

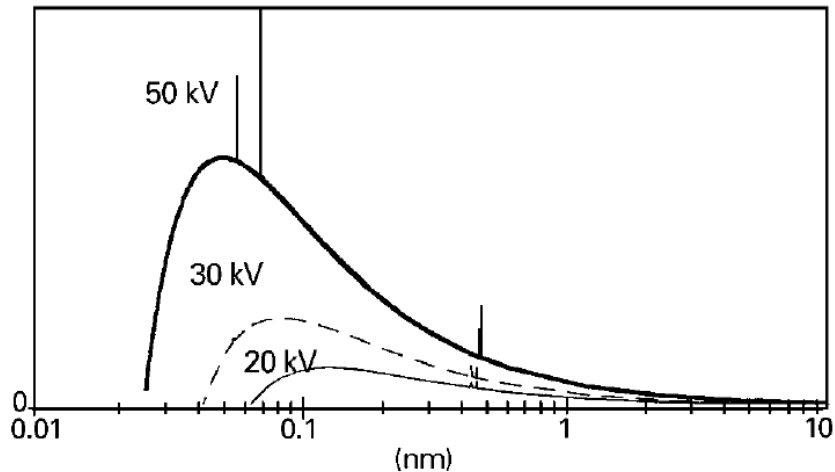


Figura 9. Espectro primário à saída do tubo de raios-X com um ânodo de Ródio

A excitação dos raios- X característicos a partir da amostra pode ser otimizada selecionando o material do ânodo, corrente e tensão do tubo apropriada. (Forshgld et al. 2000)

2.2.Detetor de raios-X

Nos detetores de raios-X a energia transportada pela radiação é convertida em formas que podem ser reconhecidas visual ou eletronicamente. Geralmente, os fótons são absorvidos pelo material do detetor e a energia é transferida por criação de pares elétron lacuna. O número de ionizações N por fóton é proporcional à energia E do fóton absorvido e depende da energia média, e , necessária para produzir um par de elétron/lacuna no detetor (Forshgld et al. 2000).

$$N=E/e \quad (2.4)$$

Na figura 10 que segue, encontra-se um esquema do feixe de fótons que incide na amostra e é detetado pelo detetor.

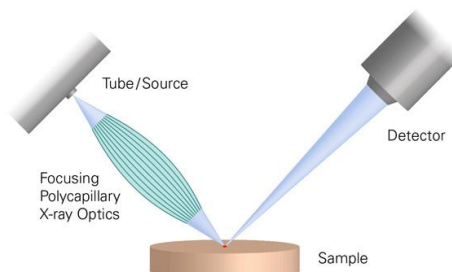


Figura 10. Feixe de fótons incidentes na amostra e sua detecção. Fonte:
<http://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elementar-analysis/micro-xrf-and-txrf/m4-tornado/technical-details/spot-size.html>

Os pares elétron/lacuna produzidos transmitem a informação como impulsos de carga. A corrente produzida no ânodo do detetor é posteriormente convertida em impulsos de tensão. Em seguida os sinais são enviados para o pré-amplificador e posteriormente para o amplificador, acabando no analisador multicanal que armazena e conta o número de impulsos de tensão, cuja amplitude se situa dentro de cada intervalo discreto correspondente a um canal (Guimarães 2007). Assim, os impulsos são distribuídos por canais e a cada impulso num canal é dado o nome de contagem que permite a obtenção de um histograma de contagens por número de canais.

Os parâmetros críticos para a escolha de um detetor apropriado são: eficiência, resolução de energia e tempo morto, ou seja, tempo de processamento de impulsos do detetor. Uma medida para a resolução de energia é a largura de metade do valor máximo de um pico, chamada FWHM, do inglês *Full Width at Half Maximum* (Forshgld et al. 2000).

2.3.Nomenclatura utilizada na análise espectral

A nomenclatura utilizada na análise de espectros de emissão de raios-X foi introduzida em 1920 por M. Siegbahn e baseia-se na intensidade relativa das linhas provenientes de diferentes séries. Esta nomenclatura não dá informação acerca da origem dessas linhas (R.Jenkins, R.Manne, R.Robin 1991). A nomenclatura dá-se para séries K, L, M que indica as transições para os níveis K,L,M respetivamente e acompanhado por letra $\alpha, \beta, \gamma, \dots$ consoante a intensidade das riscas, sendo que a alfa é a mais intensa. Assim, a letra maiúscula (primeiro índice) corresponde à camada onde foi criada a lacuna e a letra grega minúscula (segundo índice) corresponde à diferença de camadas entre as quais o elétron efetua a transição até ocupar a lacuna. Recorre-se ainda a um número (terceiro índice) para distinguir possíveis transições. Utiliza-se o número 1 para indicar a subcamada inicial que apresenta o menor valor de energia, o número 2 indica a subcamada que apresenta o segundo menor valor de energia e assim por diante.

Mais tarde, com a descoberta das linhas M e N foi necessário introduzir uma nova nomenclatura mais simples e mais abrangente para todo o tipo de transição. Esta nomenclatura é chamada IUPAC e baseia-se na caracterização energia-nível (R.Jenkins, R.Manne, R.Robin 1991).

Ao nível dos sistemas de raios-X comerciais, utiliza-se por norma a caracterização de Siegbahn em que as séries mais frequentes são as mais intensas, K e L, sendo que K serve para a caracterização de elementos leves e L para elementos pesados.

Nos anexos 1 e 2 seguem-se os esquemas de transições das camadas K e L com as nomenclaturas de Siegbahn, IUPAC e respectiva configuração eletrónica.

2.4. Diferentes riscas visíveis no espectro

Uma das vantagens desta técnica é a sua simplicidade de analisar linhas existentes no espectro, quando comparado com outros métodos de espectroscopia atômica.

As principais riscas associadas a este tipo de espectroscopia são as chamadas riscas normais, correspondendo aos picos mais intensos de cada elemento ($K\alpha$ e $K\beta$ por exemplo).

As riscas normais correspondem à emissão de radiação dipolar elétrica e obedecem a regras de seleção da mecânica quântica, utilizando os valores de (Brehm, J.J. & Mullin 1989)

- $\Delta n \geq 1$ (número quântico principal)
- $\Delta l = \pm 1$ (número quântico angular)
- $\Delta j = l + s = \pm 1$ (número quântico total)

Existem ainda outros picos com importância no espectro e que não devem ser descurados e são eles os picos de soma. Estes, observam-se quando dois fótons provenientes de uma fonte de alta intensidade são detetados com impulsos muito próximos no tempo para que o analisador de sinais não os identifique como dois eventos separados. Assim, o sinal é visto como um só e a energia registada é a soma da energia dos dois.

Para além da possibilidade de observar picos soma quando o fluxo de raios-X proveniente da amostra é grande, pode ainda ocorrer outro efeito que dificulta a análise do espectro. Este efeito ocorre quando um fóton ioniza a camada superficial do cristal do detetor com posterior libertação de energia através da emissão de um fóton característico. Caso esta emissão de energia ocorra para o interior do detetor, a energia adquirida corresponde à energia inicial do fóton. No entanto, se a emissão de energia ocorrer para fora do detetor, a energia observada será a energia do fóton incidente menos a energia do fóton emitido característico do elemento que constitui o detetor. Assim, será perdida alguma energia e no espectro observa-se um pico com energia inferior ao pico característico, ao que se chama pico de escape. No caso dos detetores de silício esta energia é de 1.74 keV, correspondente à da transição com maior probabilidade, $K\alpha$.

2.5. Absorção de raio-X ao longo da amostra

Quando o feixe de raios-X atravessa uma amostra, interage com o meio através de fenómenos de absorção e dispersão, levando a que a intensidade do feixe transmitido seja atenuada. A expressão para o cálculo da atenuação do feixe de raios-X ao longo da amostra devido a absorção ou dispersão, é dada pela lei de Lambert-Beer que relaciona a intensidade do feixe transmitido (I) com a intensidade do feixe incidente (I_0):

$$I = I_0 e^{-\mu_0 x} \quad (2.5)$$

Onde μ_0 é o coeficiente de atenuação linear que depende da energia dos raios-X e da densidade da amostra. O seu valor vem dado em cm^{-1} , e x é a espessura da amostra, dada em cm.

Para exemplificar a importância da equação 2.5, foi calculada a atenuação da radiação incidente ao atravessar filtros de Al, utilizando uma energia correspondente à energia associada à emissão do pico característico de Rh e variando a espessura do filtro. Os resultados encontram-se na tabela 3 que se segue:

Tabela 3. Atenuação para os diferentes filtros de Al, com diferentes espessuras

Espessura (μm)	I/I_0 (%)	Atenuação (%) ($100\% - I/I_0$)
12.5	98.88	1.121
100	91.37	8.627
630	56.64	43.36

Verifica-se, segundo os resultados da tabela 3, que para o filtro de 630 μm existe um valor de atenuação considerável. Assim, é de esperar que com este filtro, as intensidades dos picos característicos para energias mais baixas sejam todas atenuadas. A escolha do filtro, consoante o tipo de análise a ser feita é crucial para a obtenção de melhores resultados.

2.6.Exemplo de espectro de raios-X para o estudo em OSSOS

O espectro característico desta técnica para estudo de ossos será como o que se segue abaixo:

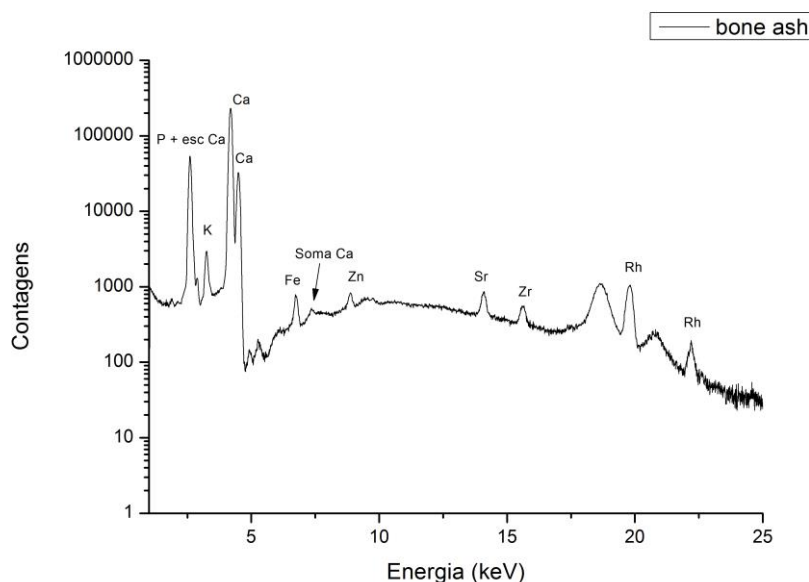


Figura 11. Espectro de padrão “bone ash”, 100 uA, 50 kV sem filtro

A análise deste espectro pode ser feita dividindo-o em 3 zonas:

1. Na zona de mais baixas energias existe elevada taxa de ruído eletrónico.
2. Na zona intermédia verifica-se então, para além da radiação de fundo proveniente de Bremsstrahlung, os picos característicos em que por exemplo no Ca encontram-se o $K\alpha$ (maior pico identificado como Ca) e $K\beta$ (pico que se surge imediatamente a seguir ao pico $K\alpha$), pico de soma e pico de escape.
3. Na zona mais à direita do espectro observam-se picos provenientes dos processos de dispersão da radiação característica proveniente do tubo de ródio. Assim podem ver-se os picos da dispersão de Rayleigh das transições $K\alpha$ e $K\beta$ do ânodo do tubo de raios-X (identificados no espectro como Rh), e à sua esquerda os correspondentes picos de Compton. Como neste trabalho foram efetuadas medidas em matrizes de osso, com elementos de peso atómico intermédio, observa-se que os picos de Compton e Rayleigh têm intensidades muito próximas.

Uma das formas de reduzir a radiação de fundo é a utilização de filtros à saída do tubo de raios-X que serão abordados mais adiante nesta dissertação.

2.6.1.Quantificação dos espectros

Após a obtenção do espectro, a sua análise qualitativa inicia-se pela identificação do pico mais intenso de $K\alpha$ ou $L\alpha$. De seguida, verifica-se a existência de outras riscas do mesmo elemento. Segue-se então o mesmo processo para o próximo pico até todos estarem identificados. De seguida é efetuado um ajuste total ao espectro fornecendo para tal ao programa WinAXIL™ (Camberra, Bélgica) quais os elementos que, após uma avaliação primária do espectro, aparentam estar presentes na amostra. Depois, e consoante a qualidade do ajuste, alguns elementos poderão ser retirados ou adicionados, até que todos os picos do espectro sejam corretamente identificados.

A análise quantitativa permite então associar valores das contagens associadas a cada energia das riscas, a valores de concentração de cada elemento em $\mu\text{g/g}$. Para tal, começa-se por quantificar amostras padrão, com elementos e respetivas concentrações conhecidas.

Depois é estabelecida a equivalência de contagens para concentração traçando-se uma reta de calibração com concentrações conhecidas e respetivo número de contagens do pico de cada elemento. Posteriormente todas as quantificações são realizadas utilizando um método comparativo com a amostra padrão, podendo então chegar a valores de concentração das amostras em análise. É estabelecida então uma correlação entre contagens e concentrações conhecidas para cada elemento, um exemplo desta correlação segue-se no gráfico abaixo, onde cada ponto corresponde a uma medição num padrão de osso e os valores da concentração são os que se encontram no certificado de cada uma das amostras padrão utilizadas:

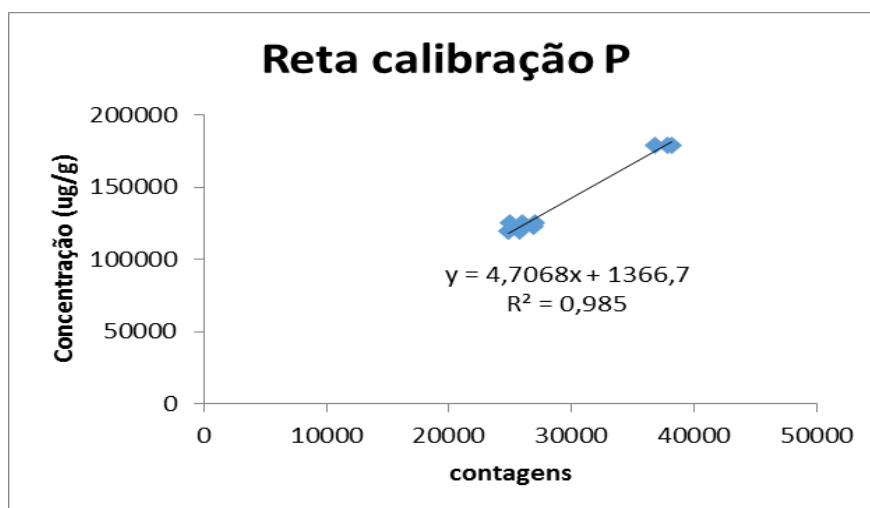


Figura 12. Reta de calibração para P

2.6.2.Limite mínimo de detecção

O limite mínimo de detecção é a quantidade mínima de concentração que se consegue quantificar de cada elemento na amostra. Assim, cada elemento tem o seu limite mínimo de detecção. A forma de o calcular é dada pela expressão:

$$DL = \frac{3C_i\sqrt{N_b}}{N_p} \quad (\mu\text{g/g}) \quad (2.6)$$

Em que C_i é a concentração tabelada no padrão de referência do elemento i , N_p é a taxa de contagem do pico correspondente (exceto a taxa de contagem de fundo) e N_b é a taxa de contagem de fundo.

A incerteza associada ao cálculo do limite mínimo de detecção é obtida através da fórmula de propagação de incertezas, utilizando as incertezas de quantificação e incertezas do ajuste do espectro (Guerra et al. 2012).

No gráfico que se segue encontra-se a curva de eficiência do detetor utilizado. É importante interligar este resultado com o limite mínimo de detecção, já que, para baixas energias (inferiores a aproximadamente 0.8 keV) o detetor não apresenta eficiência para estas. Para energias próximas de 10 keV, o detetor consegue ter maior eficiência e como tal, o limite mínimo de detecção toma valores inferiores, ou seja, como a eficiência do detetor está no seu máximo, basta uma pequena quantidade de concentração de um elemento cuja energia se situe neste intervalo de valores, para que seja possível a sua quantificação. Para energias superiores a 10 keV, o detetor vai perdendo eficiência, perdendo-a totalmente próximo dos 100 keV.

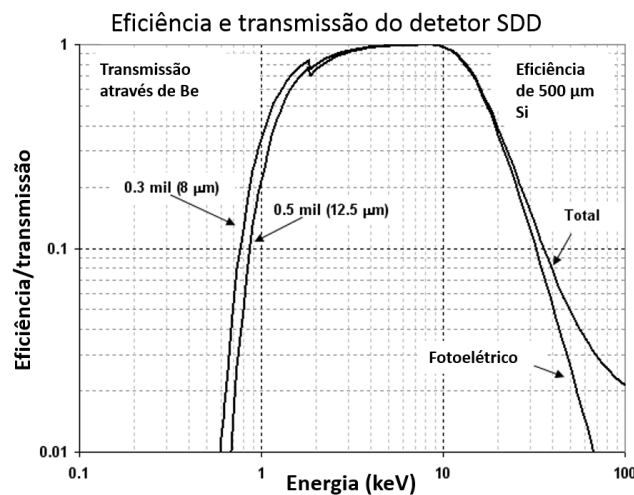


Figura 13. Gráfico da eficiência do detetor utilizado. Fonte: http://www.amptek.com/wp-content/uploads/2013/12/sdd_15.png

A técnica de PIGE (*Particle Induced Gamma-ray Emission*)

A descoberta da radioatividade em certas espécies de átomos por Becquerel em 1898 e mais tarde, em 1911, o estudo da radiação e das suas propriedades por Rutherford foram o impulso para as descobertas que se seguiram até ser desenvolvida a técnica de PIGE:

Na década de 30, começaram a ser utilizados os aceleradores de partículas produzidos por Cockcroft e Walton, permitindo desta forma realizar experiências com um feixe de partículas com energias superiores às da partícula alfa utilizada por Rutherford.

A deteção das partículas, na década de 60, com o desenvolvimento de detetores semicondutores de NaI (TI) e a produção dos aceleradores Van der Graaff, permitiram quantificar os elementos tais como Mg, O, F, C e Si.

Dez anos mais tarde, surgimento de detetores de Ge (Li), sendo este um passo importante que permitiu o início da utilização da técnica de PIGE para análise de elementos leves (Fonseca 2010).

Atualmente utilizam-se vários tipos de detetores para esta técnica. Neste projeto foi usado o detetor de Ge ultra puro Ge (HP).

A técnica de PIGE (emissão de partículas induzidas por raios-gama) permite analisar amostras bombardeando-as com um feixe de partículas aceleradas (na maior parte dos laboratórios, é mais usual a utilização de um feixe de prótons). O feixe de prótons ao ser acelerado (com energias entre os 500 a 4000 keV), incide no alvo a analisar, podendo deixar o núcleo num estado excitado. Estes decaem emitindo radiação gama com energia igual à diferença de energia entre os estados nucleares. A deteção desta radiação é observada em todos os núcleos que têm estados excitados ($A > 5$) e a partir do rendimento da emissão gama referente ao elemento que se pretende analisar, é possível uma análise quantitativa (ver secção 3.2 e 3.3 mais adiante).

Esta técnica permite uma deteção de elementos leves com maior rigor que μ -XRF. Fala-se em elementos leves, todos os elementos com Z inferior ao do Si, tais como Li, Be, B, F, O, Na, Mg, Al. Estes observam-se melhor com radiação gama já que os raios-X de

baixa energia não são facilmente detetáveis com μ -XRF devido à absorção destes no ar ou nos vários filtros, janelas e componentes do espectrómetro.

Este método, tal como μ -XRF, é um método não destrutivo, não requer pré-preparação ou manipulação da amostra e apresenta alta sensibilidade e velocidade para obtenção de dados analíticos (N.Carmona, Ortega-Feliu, Gómez-Tubío, & Villegas, 2010).

3.1. Princípios físicos de PIGE

Para compreender a técnica de PIGE, é necessário ter em conta dois conceitos:

- secção eficaz de uma dada reação nuclear;
- poder de paragem.

3.1.1. Secção eficaz

A secção eficaz é uma medida da probabilidade de uma reação ocorrer em determinadas condições experimentais. Ao colocar um detetor para registar uma partícula emitida numa direção (Θ, Φ) em relação à direção do feixe, o detetor define um pequeno ângulo sólido, $d\Omega$. A secção eficaz, σ , é dada por:

$$\sigma = \frac{R_b}{I_a N} \quad (3.1)$$

onde I_a , é o número de partículas incidentes por unidade de tempo, que interagem com N núcleos do alvo por unidade de área e R_b é a taxa de produção das partículas b do canal de saída.

Definido desta forma, a secção eficaz apresenta a dimensão de área, mas proporcional à probabilidade de uma dada reação nuclear. Como o detetor ocupa apenas um pequeno ângulo sólido $d\Omega$, não são observadas todas as partículas emitidas e consequentemente apenas uma fração da secção eficaz, $d\sigma$, pode ser deduzida.

Quando as reações nucleares não possuem uma distribuição isotrópica, as partículas emitidas possuem uma distribuição angular que depende de Θ e de Φ e é representada por $r(\Theta, \Phi)$ (S.Krane, 1988). Então,

$$dR_b = \frac{r(\theta, \varphi) d\Omega}{4\pi} \quad (3.2)$$

e portanto,

$$\frac{d\sigma}{d\Omega} = \frac{r(\Theta, \Phi)}{4\pi I_a N} \quad (3.3)$$

A quantidade $d\sigma/d\Omega$ é chamada secção eficaz diferencial e a sua medida dá informação importante da distribuição angular dos produtos de reação.

A secção transversal pode ser obtida integrando a equação (3.3) para todos ângulos com:

$$d\Omega = \sin\theta \, d\theta \, d\Phi \quad (3.4)$$

Temos então

$$\sigma = \int \frac{d\sigma}{d\Omega} d\Omega = \int_0^\pi \sin\theta \, d\theta \int_0^{2\pi} d\Phi \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (3.5)$$

Estas reações têm geometria axial, logo $d\sigma/d\Omega$ é independente de Φ e portanto o integral resulta em

$$\sigma = \int_0^\pi 2\pi \sin(\theta) \frac{d\sigma}{d\Omega} d\theta \quad (3.6)$$

Continuando a resolver a equação obtém-se

$$\sigma = 4\pi \frac{d\sigma}{d\Omega} \quad (3.7)$$

Uma das principais características da secção eficaz é o aparecimento de ressonâncias. Estes ocorrem quando, uma dada energia de determinada partícula incidente, coincide com a energia um estado excitado do núcleo composto. Assim, as ressonâncias, em física nuclear, provam a existência de estados excitados do núcleo que decaem rapidamente por dissociação ou emissão de fótons e permitem a sua determinação (S.Krane, 1988). O rendimento de uma reação nuclear é calculado integrando a secção eficaz da energia incidente ao longo da energia. Porém a forma de calcular o rendimento varia consoante a espessura do alvo: alvo fino ou alvo grosso. Um exemplo deste tipo de gráficos encontra-se na figura 14, que se segue onde são visíveis os picos de ressonância:

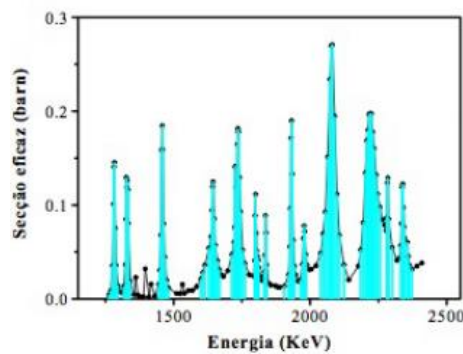


Figura 14. Secção eficaz da reação $^{23}\text{Na}(p,p',\gamma)^{23}\text{Na}$ (Fonseca, 2010)

3.1.1.1. Ressonância de alvo fino

Como o alvo apresenta espessura pequena, praticamente todo o feixe incidente atravessa-o sem haver perdas de energia significativas. Assim, o rendimento da radiação gama no elemento (e), induzido por um feixe de prótons, que se pretende estudar é dado por (Fonseca, 2010):

$$Y_{\gamma}^e(E_0, \theta_{lab}) = N_p N_e \sigma(E_{lab}, \theta_{lab}) \Omega_{\gamma} \varepsilon_{\gamma} \quad (3.7)$$

onde,

N_p é o número de prótons incidentes;

N_e é o número de átomos do elemento (e) por unidade de área;

Ω é o ângulo sólido do detetor de radiação gama;

ε eficiência do detetor;

$\sigma(E_{lab}, \theta_{lab})$ é a secção eficaz que depende da energia incidente do feixe de prótons, E_{lab} , e do ângulo do detetor de radiação gama, θ_{lab} .

3.1.1.2. Ressonância alvo grosso, secção eficaz integrada

Para amostras com espessura superior ao alcance R dos iões incidentes, com o caso das amostras que se pretendem analisar, o feixe atravessa o alvo, parando algures dentro dele. Como tal, o cálculo do rendimento necessita de alguns ajustes na equação (3.7) tornando então a forma (Fonseca, 2010):

$$Y_{\gamma}^e(E_0, \theta_{lab}) = N_p N_e \Omega_{\gamma} \varepsilon_{\gamma} \int_0^R \sigma dx \quad (3.8)$$

Torna-se então necessário integrar a secção eficaz de produção de radiação ao longo da profundidade.

No caso do ERYA, programa que vai ser utilizado neste projeto e explicado mais adiante, as secções eficazes já se encontram determinadas e como tal não será necessário calcular nenhuma secção eficaz neste projeto.

3.1.2. Poder de paragem

Quando um feixe de partículas carregadas penetra na matéria, as partículas interagem com os eletrões ligados ou livres, transferindo a sua energia para os átomos do alvo

que ficam excitados ou ionizados. Assim, vão perdendo energia com o aumento gradual da profundidade até finalmente pararem com um alcance bem definido.

Esta perda de energia associada a uma perda de velocidade da partícula incidente, é designada por poder de paragem e é dada por (Fonseca, 2010):

$$S = -\left(\frac{dE}{dx}\right) \quad (3.9)$$

onde E é a energia da partícula e x é a distância percorrida.

Como o poder de paragem depende da espessura do alvo, utiliza-se a secção eficaz de paragem:

$$\varepsilon(E) = \frac{S}{N} \quad (3.10)$$

em que S é o poder de paragem e N é a densidade atómica do elemento.

A sua quantificação torna-se importante neste tipo de técnicas, de forma a determinar a distribuição em profundidade dos elementos do alvo.

3.2. Análise qualitativa por PIGE

Um exemplo do espectro de osso obtido com esta técnica é o que se segue:

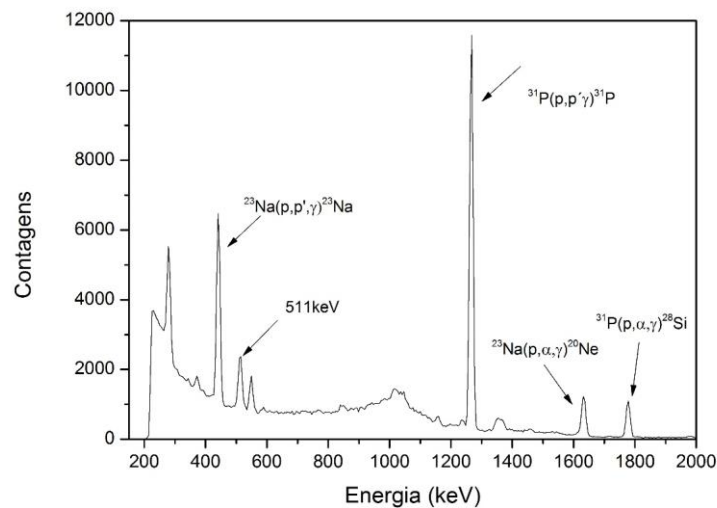


Figura 15. Espectro de osso por PIGE

Inicialmente obtém-se um espectro de contagens por canais em que este apresenta radiação de fundo. De forma a identificar a emissão de radiação gama de um determinado elemento, é necessário realizar a calibração em energia do espectro adquirido. A calibração é realizada através da identificação de pelo menos dois canais, distantes entre si, onde se encontram picos com energia conhecida e é estipulada uma regressão linear para que em todos os restantes picos sejam identificadas as energias libertadas em cada tipo de reação nuclear.

Analisando o espectro da figura 15, é possível encontrar à esquerda, 2 picos que correspondem ao raio-X do Au, vindos do colimador que é constituído por este material.

O pico mais intenso deste espectro é o da reação $^{31}\text{P}(p,p'\gamma)^{31}\text{P}$ já que se trata de um osso, matriz de hidroxiapatite, sendo que o P é o elemento com maior evidência a estas energias. Esta reação nuclear inelástica (p,p') com libertação de radiação gama, ocorre segundo o esquema a seguir apresentado para uma energia de 1266 keV. O Pico mais largo que se observa imediatamente antes deste pico, corresponde ao pico de Compton do fósforo.

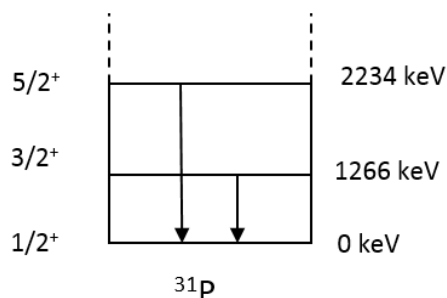


Figura 16. Diagrama dos primeiros níveis de excitação de ^{31}P (P.M.Endt, C.M.Braams .1957)

No anexo 3 encontra-se o diagrama completo dos níveis de excitação de ^{31}P .

O Q da reação é a energia resultante das diferenças de massa entre o canal de entrada e o canal de saída (Fonseca, 2010). Assim, para a reação nuclear $^{31}\text{P}(p,p'\gamma)^{31}\text{P}$, vem dado por:

$$Q = (m_p + m_{^{31}\text{P}} - m_{p'} - m_{^{31}\text{P}}) c^2 \quad (3.11)$$

Logo $Q=0$ já que se trata de uma reação (p,p', γ).

Observa-se ainda o pico correspondente à energia de repouso do eletrão (511 keV) que se forma através da aniquilação de positrões ou de produção de pares do γ de alta energia. Visto que estamos perante energias superiores que XRF, nesta técnica é de fácil observação a produção de pares que já foi explicada no capítulo anterior.

É ainda de salientar o pico correspondente à reação de sódio $^{23}\text{Na}(p,p'\gamma)^{23}\text{Na}$ visto que existem iões de Na^+ na estrutura cristalina do osso, como explicado no capítulo 1.

3.3. Análise quantitativa por PIGE (quantificação elementar)

Para analisar quantitativamente espectros obtidos nesta técnica, em 1980 B.Borderie publicou um artigo de revisão acerca da análise de elementos leves por PIGE, reconhecendo a dificuldade de integração da secção eficaz. Assim, vários autores foram desenvolvendo métodos de simplificação de cálculo, comparando com amostras padrão (com composição e espessuras conhecidas) (R. Mateus, 2004).

Nesta comparação, utiliza-se o rácio dos valores médios do poder de paragem na amostra e as amostras padrão, obtendo assim resultados da concentração com uma exatidão que depende da diferença entre a matriz de comparação da amostra e das amostras padrão (A.P. Jesus, 2000). Este método só produz bons resultados quando a composição das amostras padrão for muito semelhante à amostra a ser analisada.

3.3.1. ERYA (*Emitted Radiation Yield Analysis*)

Para melhorar o método de quantificação elementar, o grupo de reações nucleares do LibPhys FCT/UNL, desenvolveu um método alternativo para análise de elementos leves, por PIGE, sem recurso a padrões e será este o método a utilizar neste trabalho.

Inicialmente o código foi desenvolvido em ambiente de programação C. Mais recentemente foi otimizado para LabView da National Instruments, apresentando assim uma utilização mais simples, designado por ERYA (Martins, 2013).

O programa ERYA permite determinar as frações mássicas de elementos leves existentes numa amostra com composição desconhecida através dos rendimentos das várias emissões de radiação gama dos elementos leves na amostra. Isto é possível tanto para alvos finos como alvos espessos. No caso de alvos espessos o programa é capaz de integrar a secção eficaz em profundidade da amostra dividindo a amostra por camadas, de tal forma, que em cada camada, a secção eficaz de paragem seja constante.

Ao rendimento obtido pelo programa, é ainda necessário adicionar o rendimento a baixas energia, chamado γ_0 . Este rendimento serve para assegurar que as ressonâncias existentes abaixo das determinadas experimentalmente não são desprezadas. Para determinar o γ_0 , é produzida uma pastilha com a matriz do elemento específico que se pretende analisar e de seguida é calculado o rendimento à mais baixa energia incidente da presente na secção eficaz. No caso do P, esta energia foi igual a 2610 keV. Este valor varia de elemento para elemento.

Como o ERYA foi programado para executar cálculos através de uma carga de 1 μC , é necessário normalizar todos os valores de rendimento experimental para esta carga coletada. Essa correção é dada da seguinte forma:

$$\frac{\text{Área do pico}}{\text{Carga}} \times \text{Tempo morto} \quad (3.12)$$

Para a utilização do ERYA é necessário introduzir as seguintes variáveis de entrada: (Fonseca, 2010)

1. Eficiência absoluta do detetor de radiação gama;
2. Energia incidente;
3. Secção eficaz da reação nuclear;
4. Parâmetros de Ziegler;
5. Energia emitida pela radiação gama;
6. Composição inicial da amostra.

O ERYA possui uma base de dados com informações de abundância, massa, número de massa de todos os elementos da tabela periódica e secção eficaz da reação nuclear associada à emissão gama que se pretende estudar (Martins, 2013).

O cálculo da secção eficaz de paragem é obtido através de equações semi-empíricas de Ziegler et al para elementos individuais. No caso de compostos ou misturas, é aplicada a lei de Bragg.

O utilizador começa por introduzir uma matriz inicial, nesta dissertação, a matriz que se introduz é a de hidroxiapatite. Esta pode ser baseada por estequiometria da respetiva fórmula química ou a partir da informação fornecida por espectros de PIXE ou $\mu\text{-XRF}$. Posteriormente é escolhido o elemento que se pretende analisar juntamente a sua emissão de radiação gama. O programa concretiza uma rotina que ajusta simultaneamente todos os rendimentos calculados para os elementos selecionados, resultando num valor de composição da amostra. Assim, uma das vantagens do ERYA é que permite uma análise de amostras com alguma espessura, não necessitando de conhecer a sua composição inicial nem recorrer a amostras padrão, resultando num método de quantificação relativamente simples e eficiente.

Análise de Resultados

A nível de trabalho experimental, esta dissertação iniciou-se pela complementaridade da tese de doutoramento de Cátia Santos num trabalho em conjunto para a caracterização de espectros de ossos de controlo e osteoporóticos utilizando o Bruker M4 Tornado™ para a obtenção dos espectros e o programa WinAXIL™ (Camberra, Bélgica) para a respetiva caracterização quantitativa.

4.1. Materiais e métodos

4.1.1. Equipamento de μ -XRF

Neste trabalho utilizou-se o equipamento: M4 Tornado™ Bruker, Alemanha, que se encontra apresentado na figura 17.

O equipamento de μ -XRF está dividido em cinco partes:

1. Tubo de raio-X de ródio;
2. Ótica de raios-X policapilar;
3. Microscópio ótico;
4. Detector *silicon drift detector* (SDD)
5. Pré amplificador, amplificador e analisador multicanal.



Figura 17. Equipamento de μ -XRF. Fonte: <http://www.microscopy.info/Content/Press/659.jpg>

O material do ânodo do tubo de raios-X deste espectrómetro é de Rh (ródio), o tubo funciona a uma tensão máxima de 50 kV com uma potência máxima de 30 W e está apto para 5 filtros. O espectrómetro apresenta ainda uma estrutura policapilar que permite um feixe focado na amostra com um diâmetro 25 μm . As lentes policapilares apresentam a vantagem de adquirir radiação divergente num vasto ângulo sólido e focar num ponto que está localizado a vários centímetros da lente. Com este aparelho pode-se ainda efetuar análises numa atmosfera de vácuo (Van Grieken and Markowicz 2002).

O detetor é de silício, chamado SDD (*Silicon Drift Detector*) sendo este dos mais utilizados em espectrometria de raios X dispersiva em energia. A resolução em energia, FWHM, a 5.9 keV é inferior a 145 eV e contém uma área sensível de 30 mm². Apresenta um tempo morto de 2-4 μs e um alcance de energia de 1 a 60 keV (Forshgld et al. 2000).

Além da possibilidade de realizar medições sem filtros, este equipamento apresenta 5 filtros diferentes de forma a monocromatizar a radiação proveniente do tubo:

- Al 12.5 μm ;
- Al 100 μm ;
- Al 630 μm ;
- Al/Ti 100/25 μm ;
- Al/Ti/Cu 100/50/25 μm .

4.1.2. Equipamento de PIGE

Para a obtenção de espectros, neste projeto, utilizou-se o acelerador Tandem. Este acelerador de partículas de 3 MV permite produzir um feixe de prótons com energias entre 500 a 4000 keV. Na figura 18 encontra-se a representação esquemática do acelerador Tandem, 3 MV do IST/CTN, Lisboa, Portugal:

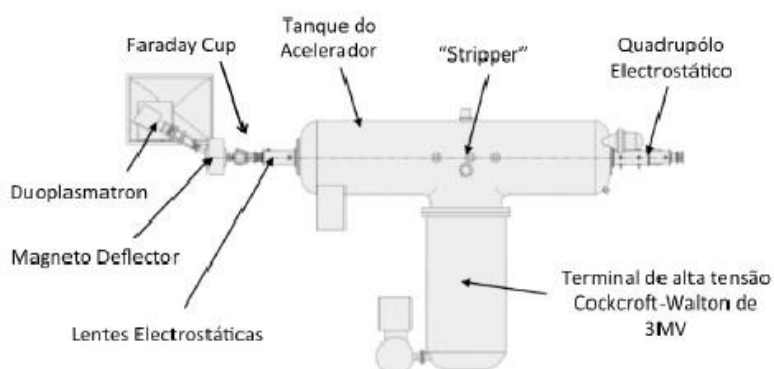


Figura 18. Representação esquemática do acelerador TANDEM (Fonseca, 2010)

Este equipamento é composto por: (Fonseca, 2010)

- Fonte duoplasmatron- sendo uma fonte de iões negativos de hidrogénio com intensidade máxima de 30 μA ;
- Tubos de aceleração: o feixe proveniente da fonte duoplasmatron é aqui acelerado, deflectido e focado;
- Tanque do acelerador a alta pressão composto por:
 - Fonte de alta tensão Cockcroft-Walton de 3 MV que acelera o feixe;
 - Canal Stripper composto por Árgon com pressão de alguns mbar

4.1.2.1. Linha de reacções nucleares

À saída do tanque do acelerador existem diversos componentes que servem para focar e direccionar o feixe até à câmara de reacções nucleares. Encontra-se de seguida um esquema da linha de reacções nucleares:

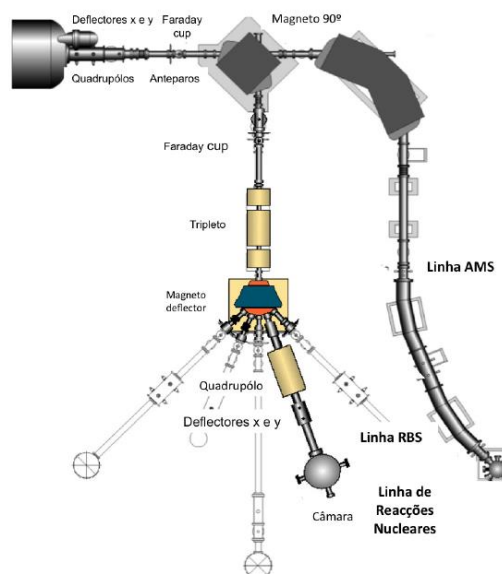


Figura 19. Linha de reacções nucleares do Tandem (Fonseca, 2010)

A linha de reacções nucleares é composta por: (Fonseca, 2010)

- Sistema de colimadores em Ta com diâmetros de 2 mm, 5 mm e 3 mm no início da linha;
- “Faraday cup” que mede a intensidade do feixe de partículas após passar pelo sistema de colimadores;

- Seis quadrupólo (tripletos e dupletos) que permite a focagem do feixe;
- Dois pares de defletores eletroestáticos que orientam o feixe para a câmara de reações nucleares;
- Colimador de Au à entrada da câmara;
- Câmara de reações nucleares;
- Sistema de câmaras de vídeo: uma câmara é utilizada na saída de focagem do tripleto e no sistema de colimação; a outra é utilizada na câmara de reações nucleares.

O feixe é produzido por uma fonte de radiofrequência e é focado por lentes Einzel existentes no início do tubo do acelerador. Depois de ser acelerado, o feixe é enviado para a linha de reações nucleares onde começa a ser focado pelos quadrupólos electroestáticos e depois é conduzido para os anteparos, passando depois pela “faraday cup” onde é medida a sua corrente. O magneto 90° desvia o feixe, fazendo-o passar pelos anteparos, é novamente medida a corrente na “faraday cup”, depois o feixe é focado no tripleto e é enviado para o magneto defletor. Depois de focado o feixe, coloca-se manualmente no colimador pretendido e a corrente é medida na “faraday cup” a seguir ao sistema de colimadores. Posteriormente é feita a focagem do feixe pelos quadrupólos e pelos defletores x e y e o feixe é por fim enviado para a câmara de reações nucleares (Fonseca, 2010).

4.1.2.2. Detetor Ge (HP)

O detetor de radiação gama é um detetor de Ge ultra puro, revestido por uma camada de alumínio. Apresenta um diâmetro de 64 mm, 62,2 mm de espessura e 0,7 mm 1 mm de camada ativa (Fonseca, 2010).

Os raios gama foram detetados por um detetor de Ge(HP) com 45% de eficiência nominal, situado a 130° em relação à direção do feixe incidente e a uma distância de 55,5 mm do alvo, que se subentende um ângulo de 100 a 160°. A eficiência absoluta do detetor em função da energia de raios gama, dada pelo produto do ângulo sólido do detetor gama pela sua eficiência intrínseca, foi obtida por medição dos teores de raio gama produzida por fontes radioativas (^{133}Ba e ^{152}Eu com energias entre 81 keV e 1,5 MeV) calibrados em atividade, bem como por meio de simulações Monte Carlo utilizando códigos GEANT e PENELOPE apresentando uma incerteza de 5%.

4.1.3. Pré-preparação de amostras:

As amostras de controlo e de osteoporose provêm de fêmures humanos. O corte foi feito em cirurgia, tendo sido retirada uma parte cilíndrica da cabeça do fémur. Posteriormente estes cilindros foram cortados em 8 amostras com uma espessura aproximada de 2 mm e diâmetro de 1 cm, utilizando uma serra de diamante. Foram por fim lavadas com água destilada e colocadas no liofilizador para a sua secagem durante 24 h. Na imagem que se segue apresentam-se as amostras do osso de controlo:



Figura 20. Amostras de osso de controlo

Para utilização da técnica de μ -XRF, as amostras foram coladas a uma fita de carbono e posicionadas sob o feixe de raios-X. Posteriormente foi realizada a técnica de PIGE utilizando as mesmas amostras e para tal foram retiradas da fita de carbono e colocadas cada uma delas sobre um porta-amostras em que este foi ajustado de forma a amostra ficar imobilizada no carregador vertical.

4.1.4. Amostras padrão

Tal como descrito no capítulo 2, a quantificação dos espectros de XRF pressupõe a utilização de amostras padrão. Assim, e visto que neste trabalho pretende-se analisar os ossos, utilizámos para o efeito os seguintes materiais certificados de referência:

- Bovine Bone (NYS RM 05-02)
- Bone Meal (SRM 1486)
- Bone ash (SRM 1400)
- Caprine bone (NYS RM 05-04)

Para fazer uma pastilha de cada padrão, como as amostras já vinham em pó, foi necessário apenas prensar a 10 toneladas numa prensa hidráulica existente no laboratório da FCT, durante cerca de 1 minuto, formando uma pastilha circular com cerca de 2 mm de espessura e 1 cm de diâmetro. Na figura 21 podem ver-se as amostras padrão utilizadas:



Figura 21. Pastilhas de amostras padrão utilizadas

As amostras foram colocadas sobre uma fita de carbono e colocadas diretamente sob o feixe de raios-X. Por fim, foram então medidas, utilizando todas as combinações de filtros do M4 Tornado, de forma a posteriormente, poder caracterizar as concentrações das amostras de osteoporose e de controlo.

No caso da técnica de PIGE, não é necessário recorrer a padrões. Porém, para o cálculo do rendimento a baixas energias γ_0 , foi feita uma pastilha de fosfato de cálcio, com concentração conhecida, da mesma forma que se realizaram as restantes pastilhas dos padrões de osso.

4.2.Otimização da técnica de micro XRF para estudo de ossos

4.2.1. Erros sistemáticos

Em μ -XRF, tal como em outras técnicas, existem incertezas associadas às medições. Normalmente os erros (ou incertezas) são separados em erros estatísticos e erros sistemáticos.

A melhor forma para reduzir os erros estatísticos é aumentar o número de medições dentro das mesmas condições experimentais. Por este motivo e para tentar minimizar estes erros, as análises por μ -XRF foram realizadas fazendo 30 pontos por amostra e para a análise por áreas, 4 áreas por amostra. No caso dos erros sistemáticos a solução ideal será aproximar o máximo possível as condições experimentais com o modelo teórico associado.

Os erros sistemáticos podem surgir de oscilações dos valores relativamente à média e estas podem surgir de diversos fatores:

Erros provocados pelo feixe:

- Existência de flutuações de intensidade;
- Distorção do perfil do feixe;
- Incertezas na largura do feixe.

Características do detetor:

- Existência de picos de soma e picos de escape;
- Recolha de carga incompleta.

Características da amostra:

- Inhomogeneidade natural da concentração elementar na amostra;
- Auto absorção da amostra;
- Variações na espessura da amostra;
- Existência de cavidades e outros efeitos topológicos (efeitos geométricos).

Análise espectral:

- Incertezas nos parâmetros fundamentais;
- Aproximações da equação de Sherman.

A nível de erros associados aos efeitos do feixe, características do detetor e análise espectral, nesta dissertação estes acabam por ser minimizados (com exceção das flutuações de intensidade do feixe) já que a análise quantitativa é feita por métodos comparativos utilizando padrões. Desta forma, estes erros sistemáticos ocorrem tanto nos padrões como nas amostras a analisar e portanto podem ser descurados.

Os restantes erros sistemáticos foram estudados nesta dissertação de forma a serem minimizados, encaminhando para uma maior fiabilidade da técnica de μ -XRF.

Podem ainda existir flutuações na tensão do tubo e como não se consegue ter a certeza da tensão da rede elétrica e que chega ao equipamento, consideramos este erro como aleatório e não como sistemático porque esta tensão pode ter sido constante durante todas as medições ou variável.

De modo a conseguir uma quantificação, mais real possível, foram inicialmente calculados os limites mínimos de deteção para μ -XRF consoante a equação (2.6). Os resultados encontram-se seguidamente:

Tabela 4. Limite de detecção calculado para cada elemento existente em cada amostra padrão (µg/g)

Padrão	Limite de detecção para cada elemento (µg/g)							
	P	K	Ca	Mn	Fe	Zn	Sr	Pb
Bovine bone	1052 ± 13	não tabelado	41 ± 1	3 ± 2	2 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	3 ± 1
Bone Meal	1063 ± 19	23 ± 1	55 ± 1	0,72 ± 0,24	3 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	1 ± 1
Bone Ash	1020 ± 13	12 ± 1	49 ± 1	7 ± 2	10 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	2 ± 1
Caprine Bone	1018 ± 12	13 ± 1	41 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	5 ± 1

4.2.2. Influência da tensão do tubo

Para a obtenção da tensão adequada a esta análise, foram efetuadas várias medições com o padrão de “bone ash”, a uma pressão de vácuo de 20 mbar, sem filtros, com uma corrente de 100 µA e variando a tensão do tubo. Os resultados estão apresentados na figura 22:

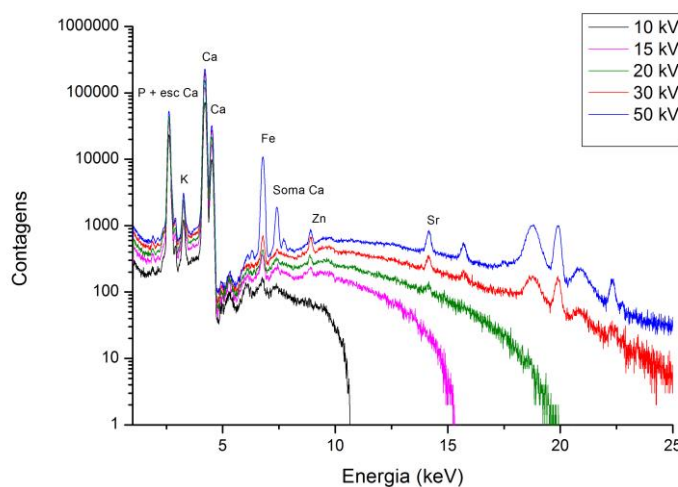


Figura 22. Gráfico de contagens por energia do padrão “bone ash” a diferentes tensões

Pela análise do gráfico, pode-se observar que para uma tensão de 10 e 15 kV, elementos traço do osso como por exemplo o estrôncio ($K\alpha = 14.165$ keV) não são observados com clareza. Para uma tensão de 20 kV o pico de estrôncio começa a tornar-se evidente mas ainda assim com uma incerteza muito grande. Aumentando a tensão para um valor ao qual todos os elementos traço do osso estão compreendidos, observa-se que a tensão de

30 kV comparativamente ao espectro de 50 kV apresenta maior ruído e os picos característicos não são tão evidenciados. Assim, e tendo em conta o valor do alcance do equipamento estar entre 5 e 50 kV, conclui-se que a tensão ideal para esta análise é de 50 kV.

4.2.3. Influência da corrente

Para a otimização da corrente foi analisado o padrão de “bone ash” sem filtros, com 50 kV de tensão, variando a corrente e avaliando o tempo morto conforme se verifica na tabela 5:

Tabela 5. Tempo morto associado ao aumento de corrente, sem filtros

<i>Corrente</i>	<i>Tempo morto</i>
30 μA	1%
50 μA	2%
100 μA	4%
200 μA	8%
300 μA	12%

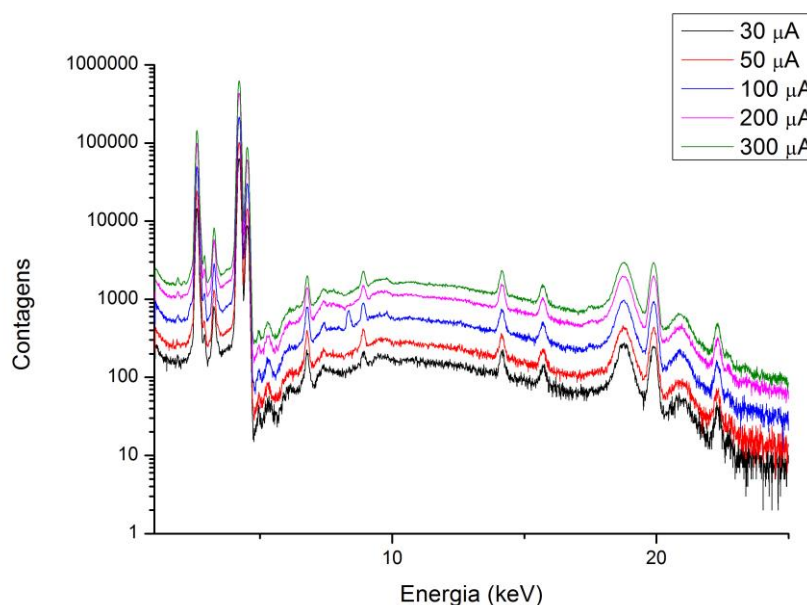


Figura 23. Gráfico de contagens por energia do padrão “bone ash” a diferentes correntes, sem filtros

A escolha da corrente ideal prende-se com o facto de necessitarmos de um tempo morto inferior a 5% de forma a reduzir a influência de picos soma e picos de escape. Assim, para esta análise sem filtros, poder-se-iam escolher correntes de 30, 50 ou 100 μA . No entanto, outro aspeto importante e decisivo na escolha da corrente prende-se com a necessidade de obtenção de um espectro com estatística suficiente e com os picos característicos

bem visíveis. Assim, para o caso da análise efetuada sem filtros, a tensão ideal é de 100 μA .

Para a escolha da corrente ideal no caso da utilização de filtros, foi realizada a mesma avaliação que a anterior, com o padrão de “bone ash” e tensão de 50 kV. Os resultados encontram-se na seguinte tabela 6 e no seguinte gráfico da figura 24:

Tabela 6. Tempo morto associado ao aumento de corrente, com filtros

<i>Corrente</i>	<i>Tempo morto</i>
100 μA	0%
300 μA	0%
500 μA	1%
600 μA	1%

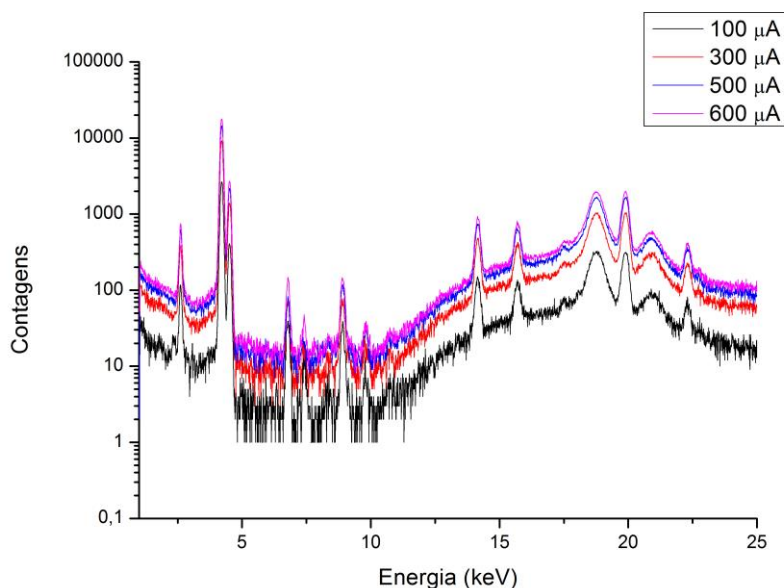


Figura 24. Gráfico de contagens por energia do padrão “bone ash” a diferentes correntes, com filtros

Estas medições foram realizadas tendo em conta o alcance do equipamento que se encontra compreendido entre 30 e 600 μA .

A escolha da melhor corrente para a análises com filtros é idêntica à análise efetuada para a análise sem filtros. Assim, como para todos os valores de corrente correspondem a valores de tempo-morto inferior a 5%, a escolha prende-se então com a estatística de aquisição e assim, a corrente ideal, como se pode verificar pela figura 24 é de 600 μA . Esta cor-

rente permite a obtenção de um espectro com menor ruído e os picos característicos apresentam-se mais evidenciados. A radiação de fundo apesar de ser superior a todos os restantes, apresenta uma razão pico/fundo melhor.

4.2.3. Otimização dos filtros para análise em ossos

A utilização de filtros à saída do tubo de raios-X provocam atenuação da radiação principalmente da radiação de fundo provocada por Bremsstrahlung. A espessura e o tipo de elemento atómico que constitui o filtro vão influenciar essa atenuação: um filtro demasiado espesso poderá não só atenuar a radiação de baixa energia, como também diminuir a intensidade de riscas características levando a resultados incorretos.

Para comprovar o efeito da atenuação da radiação consoante o aumento da espessura do filtro, foram então calculadas as atenuações para os filtros de Alumínio com espessuras de 12.5, 100 e 630 μm . Os resultados encontram-se na tabela 3 apresentada na secção 2.5.

As análises foram realizadas em vácuo, com uma pressão inferior a 20 mbar e foram escolhidos entre 20 a 30 pontos por amostra de forma a assegurar a repetibilidade e a reprodutibilidade dos resultados. Para ensaios com filtros, utilizou-se uma corrente de 600 μA , tensão de 50 kV e com um tempo de aquisição de 300s por ponto. Para o ensaio sem filtros, utilizou-se corrente de 100 μA , tensão de 50 kV e tempo de medição de 300 segundos por ponto.

No anexo 4. encontram-se os gráficos obtidos dos valores das razões Ca/P obtidas para as amostras de controlo, osteoporose e “bone ash”, utilizando todos os filtros existentes no equipamento e ainda uma análise sem filtros.

Apresentam-se então, na tabela 7, os valores obtidos da concentração para os diferentes elementos existentes nas amostras padrão. O erro foi calculado através da fórmula de propagação de incertezas. Os valores pintados a amarelo significam que estão fora do intervalo de valores admissível ou que o valor da incerteza é superior ao valor de concentração do respetivo elemento.

Tabela 7. Valores de concentração ($\mu\text{g/g}$) dos padrões de osso para diferentes filtros

Padrões	Elementos	Medido NIST	Al 12.5 μm conc \pm inc ($\mu\text{g/g}$)	Al 100 μm conc \pm inc ($\mu\text{g/g}$)	Al 630 μm conc \pm inc ($\mu\text{g/g}$)	Al/Ti 100/ 25 μm conc \pm inc ($\mu\text{g/g}$)	Al/Ti/Cu 100/50/25 μm conc \pm inc ($\mu\text{g/g}$)	sem filtro conc \pm inc ($\mu\text{g/g}$)
bovine bone	Ca	260 000	280000 \pm 23000	280000 \pm 20000	280000 \pm 18000	280000 \pm 18000	280000 \pm 34000	260000 \pm 32000
	Fe	3,2	5 \pm 3	4 \pm 7	7 \pm 7	29 \pm 73	10 \pm 11	1 \pm 2
	Mn	2,2	2 \pm 2	0	0	5 \pm 7	0	1 \pm 1
	P	120 000	120000 \pm 7000	120000 \pm 6000	120000 \pm 58000	119333 \pm 1800	120000 \pm 8000	120000 \pm 18000
	Pb	16.1 \pm 0.3	5 \pm 5	2 \pm 5	9 \pm 6	6 \pm 4	15 \pm 3	3 \pm 4
	Sr	160	174 \pm 18	170 \pm 18	170 \pm 12	180 \pm 18	173 \pm 18	174 \pm 27
	Zn	80	93 \pm 9	90 \pm 12	97 \pm 12	87 \pm 6	83 \pm 8	78 \pm 33
bone meal	Ca	265800 \pm 2400	290000 \pm 23000	280000 \pm 18000	300000 \pm 30000	290000 \pm 18000	290000 \pm 28000	290000 \pm 34000
	Fe	99 \pm 8	44 \pm 21	59 \pm 64	58 \pm 47	10 \pm 21	88 \pm 60	1 \pm 2
	K	412 \pm 4	278 \pm 16	276 \pm 44	298 \pm 49	271 \pm 45	310 \pm 47	238 \pm 55
	P	123000 \pm 1900	130000 \pm 4500	130000 \pm \pm 6000	130000 \pm 58000	130000 \pm 1800	130000 \pm 6000	130000 \pm 18000
	Pb	1.335 \pm 0.014	3 \pm 2	4 \pm 4	4 \pm 3	4 \pm 3	5 \pm 2	4 \pm 4
	Sr	264 \pm 7	290 \pm 24	277 \pm 24	299 \pm 27	273 \pm 24	286 \pm 40	171 \pm 28
	Zn	147 \pm 16	167 \pm 5	160 \pm 18	168 \pm 25	169 \pm 18	157 \pm 13	83 \pm 30
bone ash	Ca	381800 \pm 1300	310000 \pm 24000	320000 \pm 24000	330000 \pm 25000	320000 \pm 18000	320000 \pm 24000	330000 \pm 35000
	Fe	660 \pm 27	41 \pm 23	175 \pm 128	180 \pm 125	20 \pm 38	100 \pm 116	16 \pm 29
	K	186 \pm 8	220 \pm 29	237 \pm 38	209 \pm 43	240 \pm 41	225 \pm 40	247 \pm 58
	P	179100 \pm 1900	170000 \pm 5900	170000 \pm 4800	180000 \pm 15000	180000 \pm 2700	170000 \pm 6000	170000 \pm 24000
	Pb	9.07 \pm 0.12	3 \pm 2	3 \pm 3	4 \pm 3	4 \pm 3	11 \pm 2	3 \pm 3
	Sr	249 \pm 7	197 \pm 18	197 \pm 18	200 \pm 20	193 \pm 18	187 \pm 20	197 \pm 31
	Zn	181 \pm 3	117 \pm 20	126 \pm 20	137 \pm 18	140 \pm 12	147 \pm 24	155 \pm 65
caprine bone	Ca	264000	280000 \pm 18000	270000 \pm 22000	250000 \pm 22000	270000 \pm 18000	270000 \pm 18000	280000 \pm 30000
	Fe	2,9	6 \pm 4	4 \pm 5	8 \pm 9	1 \pm 3	10 \pm 9	5 \pm 6
	K	210	112 \pm 5	217 \pm 36	200 \pm 35	221 \pm 40	238 \pm 48	245 \pm 66
	Mn	1,6	1 \pm 1	0	0	3 \pm 5	0	0
	P	125000	123000 \pm 5000	119000 \pm 6000	120000 \pm 13000	130000 \pm 1800	120000 \pm 7000	130000 \pm 18000
	Pb	31.5 \pm 0.7	7 \pm 6	5 \pm 5	10 \pm 6	7 \pm 5	29 \pm 7	2 \pm 3
	Sr	150	166 \pm 20	160 \pm 26	153 \pm 13	157 \pm 12	135 \pm 24	258 \pm 41
	Zn	81	94 \pm 27	83 \pm 13	74 \pm 13	80 \pm 6	83 \pm 12	127 \pm 45

A utilização de filtros provoca alguma perda de intensidade mas é compensada pela redução da radiação de fundo. Na figura 25 apresentam-se espectros do padrão de “bone ash” obtidos com os diferentes filtros:

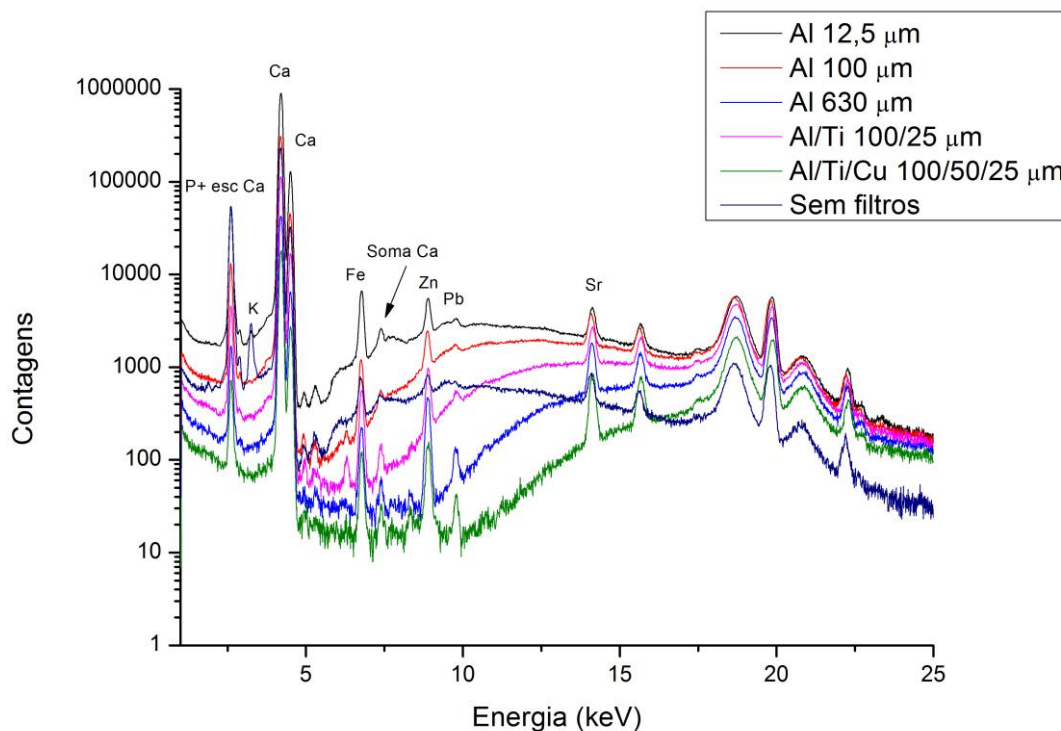


Figura 25. Gráfico do padrão “bone ash” com os vários filtros

Verifica-se que o filtro que apresenta menor fundo é efetivamente o filtro de Al/Ti/Cu apesar de apresentar maior ruído. O filtro de Al 12,5 µm é então o filtro que apresenta maior fundo, porém é com este filtro que os picos atingem maiores contagens.

Pela análise da tabela 7 verifica-se que a quantificação com o filtro de Al 630 µm apresenta incertezas mais elevadas. Pela observação do gráfico da figura 25, observa-se que o mesmo filtro apresenta bastante ruído. Como este é o filtro com maior espessura, seria esperado que a estatística do espectro seria baixa, e assim a incerteza associada é principalmente causada pelo equipamento e não tanto pela falta de homogeneidade da amostra.

A quantificação sem filtros permite uma melhor quantificação de elementos com baixo Z já que aumenta a ocorrência de ionização para estes elementos. Como tal, é sem a utilização de filtros que se consegue observar no gráfico na figura 25 o pico de K claramente evidenciado em comparação com a utilização desta técnica com filtros, no entanto a nível

de quantificação da concentração deste elemento, verifica-se que qualquer um dos filtros também permitem uma avaliação aceitável no geral dos padrões.

Pela análise do espectro (figura 25), os elementos maioritários, Ca e P, apresentam os picos mais evidenciados. Sendo assim, a quantificação destes elementos pode ser realizada com filtros ou também sem filtros.

É ainda de salientar um ponto importante relativo à quantificação de Ca e P. Como se pode verificar pelo espectro (figura 25), o pico de escape do Ca coincide com o pico $K\alpha$ de P, resultando que na quantificação seja provável que exista uma perda de contagens associadas ao Ca, reduzindo a sua concentração aparente. Consequentemente, o número de contagens do P aumenta, aumentando desta forma a sua concentração. Sendo assim, verifica-se que a quantificação destes elementos torna-se menos precisa, apesar de os valores apresentados das mesmas na tabela 7 para os diferentes filtros, estar de acordo com os valores de incerteza associada aos valores teóricos.

Para elementos como Pb, Zn e Sr, o melhor filtro é o de Al/Ti/Cu, já que ao introduzir esta combinação de filtros estamos a reduzir o fundo de dispersão na região do espectro onde estes elementos têm os seus picos característicos.

Pela análise do gráfico da figura 25, da tabela 7, conclui-se que analisando por pontos, os elementos como o Fe e Mn são de difícil quantificação por esta técnica devido ao facto de apresentarem incertezas relativas muito elevadas.

A nível da razão Ca/P verifica-se que o valor mais próximo do valor apresentado no certificado do NIST, é obtido através da análise sem filtros obtendo-se então um valor de $1,94 \pm 0,11$ para a amostra padrão de “bone ash”.

Foram ainda analisadas as amostras de controlo e osteoporose com todos os filtros, calculando-se a razão Ca/P para todos eles. Os gráficos encontram-se no anexo 4. Podem-se verificar que as razões encontram-se praticamente todas dentro do intervalo admissível de valores. Não foi efetuado nenhum tratamento estatístico dos valores que implicassem a remoção de dados, como por exemplo o critério de Chauvenet. Decidiu-se manter os resultados obtidos e apenas compreender as razões para o qual se devem os resultados que não vão de encontro ao esperado. Desta forma não se aperfeiçoou o resultado em conformidade com o esperado para não correr o risco de excluir possíveis aspetos importantes neste estudo. No entanto, caso o tivéssemos feito, alguns pontos que se encontram com valores demasiado altos ou baixos iriam ser desprezados e a razão Ca/P teria valores experimentais mais parecidos com os da literatura. A existência destes pontos poderá dever-se a fatores como:

- inhomogeneidades da amostra devido às suas irregulares e topologia;

- inhomogeneidades da amostra a nível elementar (à escala do feixe de raios-X);
- no caso do padrão de “bone ash”, poderá dever-se à aglomeração de nanopartículas de óxido de Fe que quando irradiadas ionizam secundariamente a área em redor, potenciando um aumento dos valores de Ca ou de P;
- medição efetuada fora da amostra ou no rebordo da mesma.

Como se pode observar pela tabela 7 e gráfico da figura 25, a técnica de μ -XRF permite obter bons resultados, escolhendo o melhor filtro, consoante o elemento que se pretende analisar. É verificada ainda a importância de utilizar amostras padrão com concentrações muito diferentes do conjunto de elementos que se pretende estudar, de forma a criar uma curva de calibração com uma maior gama de valores, resultando numa análise mais precisa. Para esta análise deve ter-se sempre em conta os valores dos limites mínimos de deteção (tabela 4), sendo que quando os valores de concentração estão muito próximos deste limite, as incertezas na quantificação aumentam.

4.2.5. Fatores geométricos

O parâmetro a otimizar de maior ênfase nesta dissertação trata-se dos fatores geométricos. Fez-se um estudo inovador acerca da implicação de fatores geométricos e topológicos no estudo de ossos na região trabecular. O osso trabecular é um meio anisotrópico altamente poroso constituído por uma rede unicelular aberta, com fios ou placas calcificadas chamadas trabéculas, preenchidos por medula óssea (Kang 2011). Desta forma, e como o feixe de fótons tem um diâmetro de 25 μ m, a nível microscópico, a amostra apresenta rugosidades e relevos levando o que, o feixe se incidir na parte superior da amostra, o raio-X emitido será detetado sem excesso de atenuação, porém se o feixe incidir numa zona mais interior do osso, o raio-X emitido irá sofrer atenuações até chegar ao detetador. Este efeito encontra-se esquematizado na figura 26 que se segue:

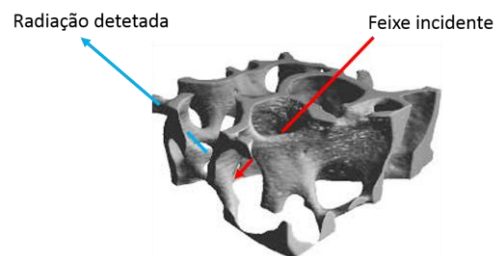


Figura 26. Representação esquemática da atenuação de um feixe de raios-X numa amostra de osso trabecular

Assim, os resultados de atenuação obtidos são diferentes daqueles encontrados na equação de Sherman, levando a razões Ca/P amplamente variáveis. Como será verificado mais adiante, esta atenuação leva a um aumento da razão Ca/P visto que os raios-X de P são mais facilmente atenuados que os de Ca.

A equação de Sherman descreve a relação entre as intensidades emitidas por uma amostra e a sua composição. Foi descrita em 1955 pelo físico Jacob Sherman ao demonstrar uma equação que permite calcular a intensidade de raios-X teórica emitida por cada elemento, quando é irradiada por um feixe policromático de raios-X. De forma a demonstrar a topologia da amostra de osso, em baixo encontra-se uma imagem microscópica da amostra de controlo:

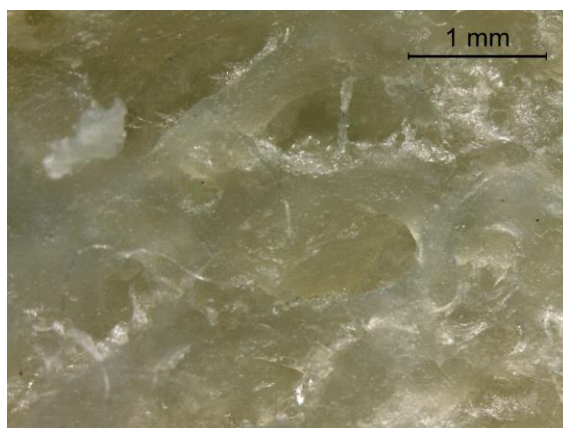


Figura 27. Imagem microscópica de osso trabecular (amostra controlo)

Para colmatar este problema e de forma a provar que há influência dos fatores geométricos na caracterização dos espectros, tentou-se pastilhar as amostras de controlo e osteoporótica, ou seja, reduzir a pó e voltar a fazer o ensaio. Para tal foram necessários os seguintes passos:

- 1) As mostras foram inicialmente moídas;
- 2) Verificou-se que ainda assim apresentavam grânulos e formava como que uma pasta. Para tentar resolver este problema, foram novamente moídas com o auxílio de azoto líquido e assim conseguiu-se obter um pó;
- 3) Posteriormente foram prensadas a 10 toneladas. Verificou-se porém, que não era possível obter uma pastilha já que apresentava ainda gordura, mesmo tendo sido liofilizadas na sua pré-preparação;
- 4) Tentou-se ainda colocar na estufa e voltar a fazer todo o processo mas não foi possível obter uma pastilha homogénea.

Todavia, como o padrão de “bone ash” apresenta na sua constituição uma matriz de hidroxiapatite de osso humano e não apresenta inomogeneidades a nível de topologia, considerou-se este como elemento comparativo para se perceber a influência dos fatores geométricos na técnica de μ -XRF. Foram então realizados novos ensaios com 30 pontos por amostra na pastilha de padrão e quantificada a razão Ca/P. Após estas medições, foram ainda analisadas as amostras de controlo, osteoporótica e o padrão de “bone ash” utilizando a técnica de PIGE.

A sua comparação poderá provar a influência dos fatores geométricos. Por PIGE, apenas é possível quantificar a concentração de fósforo já que apesar desta técnica apresentar sensibilidade para a energia do Cálcio, a secção eficaz é diminuta e como tal a probabilidade de reação é muito reduzida. Assim, foi comparada a razão Ca/P através concentração de cálcio por μ -XRF e de fósforo por μ -XRF e PIGE. Por PIGE a atenuação é desprezável já que a atenuação dos raios gama em matrizes ósseas é negligível, o feixe de prótons apresenta um diâmetro muito superior ao de μ -XRF (2 mm), é muito mais intenso, praticamente não havendo penetração de prótons na amostra, o que significa que para a espessura da amostra, não se verifiquem atenuações causadas pela existência de trabéculas.

Antes de qualquer tipo de análise laboratorial, é importante ter em conta qual o valor de atenuação de raios-X que se espera ao realizar os ensaios.

Foram analisadas ao microscópio as amostras controlo e calculadas a espessuras das trabéculas:

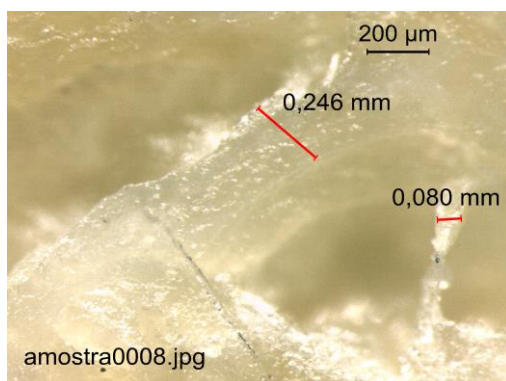


Figura 28. Imagem microscópica da amostra controlo com medição da espessura das trabéculas

A nível de dimensões das trabéculas, foram calculadas conforme se verifica na imagem que se segue:

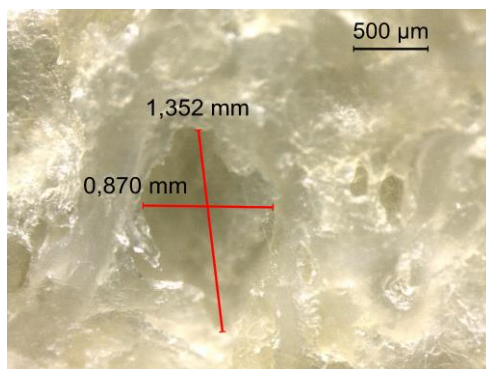


Figura 29. Imagem microscópica da amostra controlo com medição do tamanho de uma trabécula

Tendo em conta a dimensão das trabéculas, torna-se importante o conhecimento da atenuação do feixe ao longo da amostra. Como o absorvedor é o osso, composto por vários elementos que constituem a matriz de hidroxiapatite, o seu coeficiente de atenuação é calculado a partir dos coeficientes de atenuação para os elementos constituintes de acordo com a média ponderada:

$$\mu = \sum_{i=1}^n W_i \mu_i \quad (4.2)$$

Onde W_i é a fração mássica do elemento i e n é o número total de elementos constituintes.

A densidade do osso esponjoso é de $1.18 \pm 0.05 \text{ g/cm}^3$. Sabe-se ainda que o osso esponjoso apresenta na sua constituição: 7 átomos de Ca, 9 átomos de H, 40 de C, 3 de N, 37 de O, 3 de P, 2 de S e 1 átomo de Fe (URL SRIM: www.srim.org). Para o cálculo da sua fração mássica basta multiplicar o valor da massa atómica de cada elemento pelo número de átomos que constitui o osso e por fim dividir pela soma dessas multiplicações. Isto é,

$$\frac{\text{número de átomos do elemento no osso trabecular} * \text{massa atómica do elemento respectivo}}{\sum (\text{números de átomos do elemento no osso trabecular} * \text{massa atómica do elemento respectivo})} \quad (4.3)$$

No caso do Ca,

$$\frac{7 * 40}{7 * 40 + 9 * 1 + 40 * 12 + 3 * 14 + 37 * 16 + 3 * 31 + 2 * 32 + 1 * 56} \cong 0.173 \quad (4.4)$$

Obtém-se então o valor da fração mássica para os restantes elementos.

Para o elemento P sabe-se que a energia da linha característica $K\alpha$ é de 2.02 keV e para a $K\beta$ é de 2.14 keV. Foram então retirados do NIST os valores do coeficiente mássico de atenuação linear (μ/p em m^2kg^{-1}) para 2 keV e calculado o valor de cada elemento para o osso trabecular, utilizando a equação (4.2). Os resultados encontram-se na tabela 8:

Tabela 8. Valores de coeficiente mássico de atenuação linear (μ/ρ) para os diferentes constituintes do osso trabecular para 2 keV

<i>Elemento</i>	<i>μ/ρ ($m^2 kg^{-1}$) NIST</i>	<i>Fração mássica</i>	<i>μ/ρ ($m^2 kg^{-1}$) \times fração mássica osso trabecular</i>
Ca	7,999E+02	0,173	1,384E+02
H	1,059E+00	0,011	1,175E-02
C	3,060E+02	0,297	9,078E+01
N	4,769E+02	0,026	1,238E+01
O	6,949E+02	0,366	2,542E+02
P	3,018E+02	0,056	1,678E+01
S	3,853E+02	0,040	1,524E+01
Fe	1,626E+03	0,032	5,219E+01

Somando todos os valores de μ/ρ para osso trabecular e multiplicando pelo valor da densidade do osso respetivo, obtém-se que o valor de μ para 2 keV é de 684.4 cm⁻¹. Para o elemento Ca sabe-se que a energia da linha $K\alpha$ é de 3.69 keV e da $K\beta$ é de 4.01 keV. Aplicando o mesmo método, obtém-se para 4 keV os seguintes resultados:

Tabela 9. Valores do coeficiente mássico de atenuação linear (μ/ρ) para os diferentes constituintes do osso trabecular para 4 keV

<i>Elemento</i>	<i>μ/ρ ($m^2 kg^{-1}$) NIST</i>	<i>Fracção mássica</i>	<i>μ/ρ ($m^2 kg^{-1}$) \times fração mássica osso trabecular</i>
Ca	1,218E+02	0,173	2,107E+01
H	4,546E-01	0,011	5,046E-03
C	3,778E+01	0,297	1,121E+01
N	6,166E+01	0,026	1,601E+00
O	9,315E+01	0,366	3,408E+01
P	5,242E+02	0,056	2,915E+01
S	6,338E+02	0,040	2,507E+01
Fe	2,567E+02	0,032	8,240E+00

Calculando da mesma forma que anteriormente, o valor de μ para 4 keV é de 153.87 cm⁻¹.

Aplicando então a lei de Lambert-Beer para o cálculo da atenuação, variando a espessura, os resultados são os seguintes (equação 2.5):

Para uma energia de 2 keV:

Tabela 10. Valores da atenuação no osso para diferentes espessuras com energia de 2 keV

<i>Espessura (μm)</i>	<i>I/I0 (%)</i>	<i>Atenuação (100%- I/I0)</i>
5	71	29,00
10	50,44	49,56
50	3,26	96,74
100	0,11	99,89
150	0	100,00
500	0	100,00
1000	0	100,00

Para uma energia de 4 keV:

Tabela 11. Valores da atenuação no osso para diferentes espessuras com energia de 4 keV

<i>Espessura (μm)</i>	<i>I/I0</i>	<i>Atenuação (100%- I/I0)</i>
5	92,6	7,41
10	85,74	14,26
50	46,33	53,67
100	21,47	78,53
150	9,95	90,05
500	0,05	99,95
1000	0	100,00

Tendo em conta as dimensões das trabéculas apresentadas acima nas figuras 28 e 29 é então esperado notarem-se atenuações significativas a nível do P utilizando a técnica de μ -XRF.

4.2.5.1. Análise por PIGE

Nesta técnica, um feixe de prótons de 2,8 MeV foi produzido pelo acelerador Tandem a 3 MV descrito na secção 4.1.2 e uma corrente de 10 nA. Como neste trabalho se utilizaram amostras isolantes, o escoamento da carga acontece através de faíscas. Para evitar esse fenómeno de forma a não interferir com a carga foi utilizado um canhão de eletrões.

Os raios- γ foram adquiridos por um detetor de germânio de alta pureza (com uma direcção de feixe de 130°). De forma a calcular o rendimento γ_0 e garantir a fiabilidade dos nossos resultados, foi medida a pastilha de fosfato de Cálcio a uma energia de 2610 keV. Para o pico de 1266 keV (já que $^{31}\text{P}(p,p'\gamma)^{31}\text{P}$ apresenta um limiar $E = 1266 \text{ keV}$), a área

obtida foi de 8051, com uma carga de 5 μC e tempo morto de 1.0048%. Assim, utilizando a equação (3.12), obteve-se γ_0 de 1618.

Para assegurar a reprodutibilidade das medições, foram realizados 3 ensaios no mesmo ponto e nas mesmas condições experimentais, verificando-se que não existiam variações significativas no rendimento. Foram então analisadas as amostras de osteoporose, controlo e padrão “bone ash”. Como referido anteriormente, a quantificação através do ERYA não necessita de recorrer a amostras padrão. No entanto, foi analisada a amostra de “bone ash” já que não se conseguiu pastilhar a amostra controlo e desta forma podermos comparar os resultados com e sem pastilha e aferir sobre os fatores geométricos.

As amostras foram analisadas com uma energia de 2788.38 keV e carga de 5 μC . Para analisar no ERYA, os rendimentos foram normalizadas para uma carga de 1 μC . As concentrações da matriz inicial a inserir no ERYA para o “bone ash” foram as apresentadas no certificado e para as amostras controlo e osteoporose, utilizaram-se as concentrações apresentadas por (Zhang et al. 2005).

O grupo de reacções Nucleares determinou a secção eficaz da reacção $^{31}\text{P}(\text{p},\text{p}'\gamma)^{31}\text{P}$, permitindo desta forma a quantificação do $^{31}\text{P}(\text{p},\text{p}'\gamma)^{31}\text{P}$ pelo ERYA. De forma a integrar um maior número de ressonâncias da secção eficaz, observou-se que se deveria ter realizado este teste com energias mais elevadas. No entanto tal não foi possível, visto que a determinação da secção eficaz foi mais morosa do que prevista inicialmente.

4.2.5.2. Análise por $\mu\text{-XRF}$

Para a quantificação de Ca e P, tanto para as amostras de controlo e osteoporótica como para a amostra de “bone ash”, foram medidos 30 pontos em cada amostra, utilizando o filtro de Al/Ti/Cu a uma tensão de 50kV e 600 μA e posterior análise sem filtros a uma tensão de 50kV e corrente de 100 μA . Esta análise, tal como todas as análises realizadas com $\mu\text{-XRF}$ nesta dissertação, foi realizada em vácuo com uma pressão inferior a 20 mbar. Foram então quantificadas através do WinAXIL (Cambera, Bélgica).

4.2.5.3. Comparação de resultados das técnicas de μ -XRF e PIGE

De forma a comparar estas duas técnicas e investigar sobre a possibilidade de influência das uniformidades topológicas das amostras, foram calculadas as razões Ca/P e os resultados seguem-se na figura 30 e na tabela 13

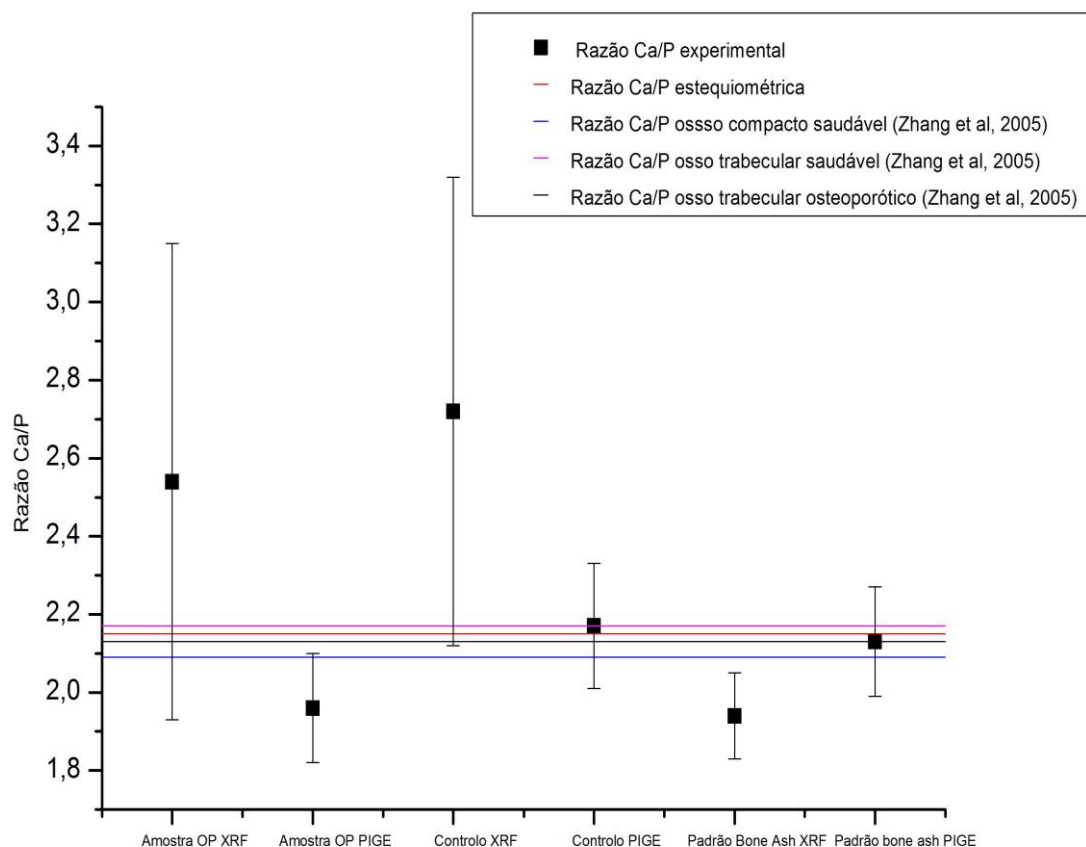


Figura 30. Comparação da Razão Ca/P para as diferentes amostras utilizando XRF e PIGE

Na tabela que se segue encontram-se os valores teóricos da razão Ca/P (tabela 12) alcançados por (Zhang et al. 2005) já anteriormente apresentados na tabela 2, o valor teórico que corresponde ao valor estequiométrico da matriz de hidroxiapatite para as amostras de osso osteoporótico e controlo já calculado na secção 1.2. e o valor da razão Ca/P calculado através do certificado do NIST.

Tabela 12. Razões Ca/P para as diferentes amostras encontradas na bibliografia

Razão Ca/P	Razão Ca/P		
	Osso compacto	Osso esponjoso	Valor teórico
Amostra osso osteoporótico	-----	1,96	2,15
Amostra osso controlo	-----	2,17	2,15
Amostra padrão bone ash	2,09	-----	2,13 ± 0,03**

**** valor obtido através das concentrações existentes no certificado. Fonte:**

<https://www.s.nist.gov/srmors/certificates/1400.pdf?CFID=33849693&CFTOKEN=4cf9a9883c3dbeab-8A32569A-B5B9-9C88-1036D75792B0AEA0>

Os valores da razão Ca/P obtidos utilizando a técnica de μ -XRF utilizando os diferentes filtros e por PIGE encontram-se na tabela 13 que se segue:

Tabela 13. Razões Ca/P para as diferentes amostras obtidas por XRF e PIGE

	Razão Ca/P						
	Al 12.5 μ m	Al 100 μ m	Al 630 μ m	Al/Ti 100/25 μ m	Al/Ti/Cu 100/50/25 μ m	sem filtro	PIGE
Amostra osso osteoporótico	3,76 ± 1,70	2,91 ± 1,07	3,15 ± 1,09	3,16 ± 1,05	2,80 ± 0,63	2,54 ± 0,61	1,96 ± 0,14
Amostra osso controlo	2,94 ± 0,70	2,93 ± 0,85	3,84 ± 1,43	3,22 ± 1,11	2,99 ± 0,92	2,72 ± 0,60	2,17 ± 0,16
Amostra padrão bone ash	1,87 ± 0,11	1,76 ± 0,05	1,84 ± 0,07	1,78 ± 0,04	1,92 ± 0,08	1,94 ± 0,11	2,13 ± 0,14

Pelo gráfico da figura 30 e pelas tabelas 12 e 13, observa-se que para XRF, obtém-se uma razão Ca/P mais próximas dos valores da bibliografia fazendo uma análise sem filtros. Comparando os resultados de XRF com PIGE, os resultados de PIGE são muito mais precisos já que se encontram mais próximos dos valores encontrados na bibliografia. Para a amostra de osso osteoporótico e controlo, a razão Ca/P por PIGE é inferior à verificada por XRF. Este resultado é de grande valor científico, tendo em conta a atenuação de fósforo apenas para 5 μ m é de aproximadamente 29%, e visto o tamanho das trabéculas ser considerável (ver figuras 28 e 29), é observada uma diminuição da concentração de P, resultando numa razão Ca/P superior para XRF.

Quando se trata de uma amostra pastilhada, como é o caso do padrão de “bone ash”, não são verificadas atenuações no P. No entanto, devido ao feixe de XRF ser de apenas 25 μ m, apesar de as amostras padrão serem normalmente consideradas homogéneas, existem algumas variações dos valores de concentração. Isto deve-se ao facto do diâmetro do feixe

ser tão reduzido que mesmo a amostra sendo supostamente homogênea, existem aglomerações de elementos provocando pequenas variações nos resultados. Este erro sistemático será estudado no subcapítulo mais adiante.

Estes resultados foram apresentados em posters em 2 conferências: IBA 2015 (C. Santos et al, 2015) e CSI 2015 em que o poster desta última conferência encontra-se no anexo 5.

4.2.6. Inomogeneidades naturais da amostra

Com o avançar deste estudo, constatou-se uma dificuldade na quantificação da concentração de Fe já que, para as amostras padrão, este tomava sempre valores inferiores ao encontrado no certificado. Um dos motivos seria que o valor esperado encontra-se muito próximo ao limite mínimo de detecção deste elemento. Porém, para a pastilha de “bone ash”, este raciocínio não se aplica visto que no certificado a concentração de Fe é de $660 \pm 27 \mu\text{g/g}$ e o limite mínimo de detecção do Fe é de $10 \pm 1 \mu\text{g/g}$. Assim, depois de analisar na bibliografia, constatou-se que o ferro ao estar em contacto com o meio ambiente reage com o oxigênio formando óxido de ferro e vários autores demonstraram a evidência da formação de agregados óxidos de ferro em líquidos e sólidos, sendo estes responsáveis, por exemplo, pela formação e estabilização estrutural de solos (Ferreira et al. 2007).

Assim, considerou-se a hipótese de, depois ou antes de concebida a pastilha de cada amostra padrão, poderem haver formação de aglomerados de Fe em que, ao analisar por pontos, corre-se o risco de não atingir esse aglomerado e como tal, o resultado da quantificação fica aquém do esperado ou de se atingir um destes aglomerados e de os resultados serem muito elevados.

Para verificar este possível fenômeno, decidiu-se medir a mesma amostra com pontos e posteriormente fazer a mesma análise mas desta vez dividindo a amostra em 4 áreas. Ao analisar por áreas previa-se que, caso existissem esses aglomerados de Fe, conseguiríamos alcançá-los e fazendo média com a restante área que não apresentaria a mesma concentração de Fe, obter uma melhor quantificação.

Assim, as amostras foram analisados num ambiente de vácuo de 20 mbar, com uma tensão de 50 kV, corrente de 100 μA e sem filtros. Foram medidos 3 pontos por cada amostra de padrão e quantificados. Posteriormente foram novamente medidas cada amostra padrão mas desta vez, em vez de pontos, utilizaram-se 4 áreas por amostra e quantificadas. Os resultados foram os seguintes:

Tabela 14. Valores de concentração dos elementos constituintes das amostras padrão (µg/g)

Padrões	Elementos	Medido NIST	Com áreas sem filtros	Com pontos sem filtros
	Sr	160*	180 ± 13	174 ± 27
bovine	Ca	260 000*	280000 ± 18000	260000 ± 32000
bone	Fe	3,2*	6 ± 4	1 ± 2
	Zn	80*	90 ± 5	78 ± 33
	P	120 000*	120000 ± 5000	120000 ± 18000
	Pb	16.1 ± 0.3	13 ± 4	3 ± 4
	Pb	1.335 ± 0.014	10 ± 3	4 ± 4
bone meal	Sr	264 ± 7	275 ± 16	171 ± 28
	Ca	658000 ± 24000	280000 ± 15000	290000 ± 34000
	Fe	99 ± 8	23 ± 11	1 ± 2
	Zn	147 ± 16	150 ± 10	83 ± 30
	K	412 ± 4	293 ± 36	238 ± 55
	P	123000 ± 19000	130000 ± 4200	130000 ± 18000
bone ash	Pb	9.07 ± 012	14 ± 4	3 ± 3
	Sr	249 ± 7	203 ± 15	197 ± 31
	Ca	381800 ± 13000	330000 ± 16000	330000 ± 35000
	Fe	660 ± 27	63 ± 29	16 ± 29
	Zn	181 ± 3	143 ± 11	155 ± 65
	K	186 ± 8	234 ± 32	247 ± 58
	P	179100 ± 19000	180000 ± 7072	170000 ± 24000
caprine bone	Sr	150*	155 ± 12	258 ± 41
	Zn	81*	88 ± 7	127 ± 45
	Fe	2,9*	5 ± 3	5 ± 6
	Ca	264000*	270000 ± 12000	280000 ± 30000
	K	210*	210 ± 26	245 ± 66
	P	125000*	120000 ± 4800	130000 ± 18000
	Pb	31.5 ± 0.7	16 ± 5	2 ± 3

***Valores sem incertezas calculadas associadas**

A nível de Fe verificaram-se melhorias na quantificação com área em vez de pontos. A nível de quantificação por pontos verifica-se uma grande discrepância nos valores de ferro. Quando se consideram áreas, apesar de nesta última análise conseguir-se integrar cada área adquirida e calcular a média de todas as áreas, os valores de concentração continuam longe dos valores tabelados. No entanto, esta última forma de aquisição permite uma diminuição das incertezas relativas. Estas aglomerações foram confirmadas através da recolha de um mapeamento de imagem dos padrões utilizados. Os resultados desta análise tornam-se mais evidentes para os padrões de “bone meal” e “bone ash” já que estes apresentam as maiores concentrações de ferro: 99 e 660 µg/g respetivamente. Seguem-se então as imagens de mapeamento para o ferro dos referidos padrões:

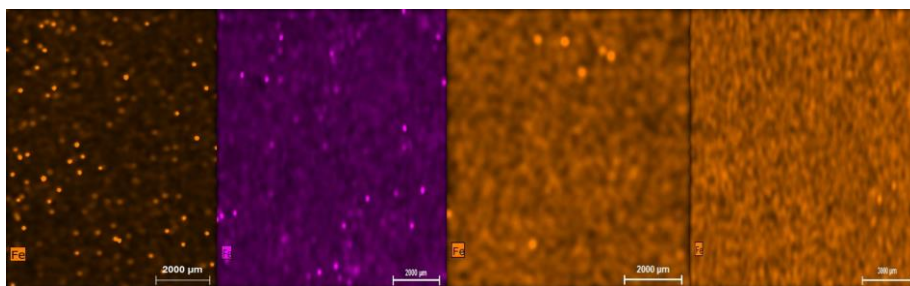


Figura 31. Mapeamento Fe, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone

Foram ainda realizados mapeamentos dos restantes elementos quantificados no osso, de forma a perceber se esta aglomeração também ocorreria. Os mapeamentos para os restantes elementos encontram-se no anexo 6. Não se verificou para o caso de Pb e dos restantes elementos, apesar dos seus valores de concentração analisados com áreas, regra geral, aproximam-se mais do valores tabelados pelo NIST do que quando analisados por pontos. As incertezas também se verificam menores, melhorando assim os resultados na análise por áreas. Verificou-se ainda, que quando o feixe incide num ponto onde existe uma aglomeração de ferro, este ioniza-se e ioniza os elementos com energia inferior ao ferro, resultando num aumento de contagens para estes elementos também traduzindo-se num aumento de concentração dos mesmos. Falamos por exemplo de elementos como o Ca e o P.

Foi ainda calculada a razão Ca/P para comparar o seu valor com medição por áreas ou por pontos. Os resultados foram os seguintes:

Tabela 15. Comparação da razão Ca/P certificada com as razões obtidas através da medição com áreas e com pontos

Razão Ca/P	NIST	Com áreas Sem filtros	Com pontos Sem filtros
Bovine bone	2,17*	2,33 ± 0,18	2,17 ± 0,42
Bone meal	2,16 ± 0,04	2,15 ± 0,14	2,23 ± 0,5
Bone ash	2,13 ± 0,03	1,83 ± 0,12	2,54 ± 0,55
Caprine bone	2,11*	2,25 ± 0,14	1,65 ± 0,25

** valores obtidos sem incerteza calculada*

Na tabela 15 acima apresentada, verifica-se que os valores da razão Ca/P encontram-se mais próximos do valor apresentado pelo certificado, como seria expectável visto que anteriormente foi verificada essa mesma aproximação de valores com a concentração de Ca e P. O valor da razão de “bone ash” com análise por pontos, sem filtros, é diferente da obtida no subcapítulo anterior visto que, para o estudo anterior foram efetuados 30 pontos por amostra e neste caso, apenas 3. Assim, a estimativa torna-se diferente, tendo em conta os erros sistemáticos aqui já apresentados neste subcapítulo que, apesar de a amostra ser considerada homogênea, os aglomerados de Fe provocam alterações na quantificação da concentração de Ca e P.

Conclusão

Neste trabalho conseguiu-se otimizar a técnica de μ -XRF para o estudo de ossos com osteoporose, reduzindo os erros estatísticos, ao aumentar o número de medições nas mesmas condições experimentais, fazendo 30 pontos por amostra ou dividindo a amostra em 4 áreas ao analisar no espectrómetro Bruker M-4 Tornado.

Como a quantificação é feita por métodos comparativos, é necessário recorrer a padrões com concentração conhecida e com matriz idêntica ao material a estudar. Neste estudo foram utilizados 4 padrões de osso sendo que as concentrações de cada elemento traço variavam para cada padrão, de forma a se conseguir obter uma reta de calibração com uma maior gama de valores, permitindo uma quantificação elementar mais coerente.

Alguns dos erros sistemáticos foram minimizados ao escolher a tensão e corrente ideais para a análise de ossos. Adicionalmente, foram ainda verificados os filtros mais adequados para a análise de um determinado elemento e conclui-se que para elementos com menor número atômico, tais como P, K, Ca, a melhor opção é não utilizar nenhum dos cinco filtros disponíveis e utilizar uma tensão de 50 kV e corrente 100 μ A, permitindo desta forma, que o pico $K\alpha$ destes elementos esteja mais evidenciado por haver maior ionização. Para elementos como Zn, Sr, Pb dever-se-á utilizar o filtro combinado de Al/Ti/Cu 100/50/25 μ m, com uma tensão de 50 kV e corrente de 600 μ A, visto que é com este filtro que se obtém menor radiação de fundo e permitindo assim uma maior evidência destes picos no espectro. Elementos como Fe e Mn são de difícil quantificação visto que a concentração destes elementos no osso, encontra-se perto dos limites de detecção do equipamento. No entanto, a melhor forma de os quantificar é com tensão de 50 kV, corrente de 100 μ A e sem filtros, visto serem elementos com baixo número atômico, comparativamente ao Pb.

Devido à topologia das amostras de osso não ser plana, devido à presença de trabéculas, neste trabalho procedeu-se a um estudo original acerca dos apelidados fatores geométricos. Conclui-se que existiam atenuações ao longo da amostra para elementos de baixas energias, como por exemplo o P. Assim, a sua quantificação era imprecisa e a razão Ca/P apresentava valores muito superiores visto a concentração aparente de P ser menor. Assim, as mesmas amostras foram analisadas com a técnica de PIGE, visto que para uma energia de 1266 keV, a atenuação de radiação gama nas trabéculas ser desprezável, verificou-se que os resultados estavam em conformidade com os valores da literatura. Ao comparar estes resultados com a pastilha de um padrão de osso ("bone ash") com concentração conhecida, utilizando μ -XRF e PIGE, verifica-se que a razão Ca/P se encontra muito mais precisa e exata, ao comparar estes valores com os valores existentes no certificado da amostra.

Conclui-se então que para amostras com este tipo de topologias associadas, a técnica de μ -XRF apresenta um valor de incerteza elevado. Para reduzir esta incerteza, dever-

se-á pastilhar a amostra. Neste trabalho tentou-se pastilhar as amostras de controlo e osteoporótico mas não foi possível visto que mesmo depois de secas no liofilizador e moídas com azoto líquido, não formarem um pó para ser prensado.

Estes resultados foram apresentados sob a forma de um poster no Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX (CSI 2015), Figueira da Foz, entre 30 de Agosto a 3 de Setembro. Este encontra-se no anexo 5.

Outro fator importante a ter em conta é a homogeneidade da amostra a nível de concentração. Verificou-se que como feixe é de apenas 25 μm , mesmo com uma amostra pastilhada, encontram-se aglomerados de elementos como o Fe. Supõe-se que micropartículas de óxidos de ferro se formam no padrão de osso, ao entrar em contacto com o ar. No entanto, a quantificação torna-se influenciada por estes aglomerados já que, a concentração de Fe não é a mesma ao longo da amostra e, quando o feixe incide sobre as micropartículas, estas ionizam os elementos com menor número atómico, como por exemplo Ca e P e como tal, a concentração obtida é maior do que o valor encontrado no certificado. Assim, para reduzir este erro sistemático, dividiu-se a amostra em 4 áreas e o resultado da quantificação foi mais preciso já que, é integrada toda a secção envolvente e não apenas um ponto.

A tabela 15 é a suma de todo o estudo visto que aqui se encontram otimizados todos os fatores propostos nesta dissertação para os elementos de Ca e P: tensão 50 kV, corrente 100 μA ., análise de amostras pastilhadas para reduzir os fatores geométricos e por fim uma quantificação por áreas para colmatar o problema das inomogeneidades naturais da amostra. Assim, a razão Ca/P obtida resulta no melhor valor encontrado utilizando a técnica de $\mu\text{-XRF}$.

Esta técnica poderá ainda ser otimizada utilizando como quantificação parâmetros fundamentais, não necessitando assim de padrões para determinar a concentração de elementos na amostra. Quanto à quantificação de ossos utilizando $\mu\text{-XRF}$, um plano futuro poderá ser encontrar uma solução para pastilhar as amostras de controlo e osteoporose de forma a reduzir os efeitos geométricos existentes na amostra.

Seria ainda interessante analisar amostras com outro tipo de doenças reumáticas, verificando se existem variações significativas da concentração elementar.

Esta dissertação promove ainda para que, no futuro seja desenvolvido um equipamento de raios-X em dispositivo portátil, capaz de quantificar in vivo, a concentração de elementos maioritários e elementos-traço. Assim, será um método de diagnóstico muito precoce para diferentes doenças reumáticas como a osteoporose, que provoquem alterações de elementos na matriz de hidroxiapatite.

Bibliografia

- Aaseth, Jan, Georges Boivin, and Ole Andersen. 2012. "Osteoporosis and Trace Elements - An Overview." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26 (2-3). Elsevier gmbh.: 149–52. Doi:10.1016/j.jtemb.2012.03.017.
- Anon., 2005. Capítulo 6: Sistema esquelético, ossos e tecido ósseo. In: *Anatomia e Fisiologia*. Lisboa: Lusociência, pp. 173-197.
- Bratter.P. 1983. "Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology." *Academic, New York* 2.
- Brehm, J.J. & Mullin, W.J. 1989. *Introduction to the Structure of Matter*. Wiley: United States of America.
- Canhão, H. & Branco, J. C., 2013. Epidemiologia das doenças reumáticas. In: *Reumatologia fundamental*. Lisboa: Lidel, pp. 1-5.
- Canhão, Helena, e Jaime C. Branco. "Epidemiologia das doenças reumáticas." Em *Reumatologia fundamental*, de João Eurico Cabral da Fonseca, Helena Canhão, & Mário Viana de Queiroz, 1-5. Lisboa: Lidel, 2013.
- Capela, Susana. "Osteoartrose e Hiperostose Idiopática Difusa." Em *Reumatologia fundamental*, de João Eurico Cabral da Fonseca, Helena Canhão, & Mário Viana de Queiroz, 117-123. Lisboa: Lidel, 2013.
- Carmona.N, Ortega-Feliu.I, Gómez-Tubío.B, e Villegas. A. M. "Advantages and disadvantages of PIXE/PIGE, XRF and EDX spectrometries applied to archaeometric characterisation of glasses." Em *Materials characterisation*, 257-267. 2010.
- Carneiro Angelo, Pina Sofia, Moreira. Bruno "Arterial Spin Labeling: Experiência Inicial, Indicações Clínicas e Dificuldades." *Acta Med Port* , 25 de Jul-Aug de 2012: 1-6.
- Census, Reuma. "epireumapt." Portugal, 2011-2013.
- Clemente, Elvo, and Emilio A.Jeckel Neto. 2002. *Aspectos Biológicos E Geriátricos Do Envelhecimento*. 2nd ed. Edipucrs.
- Eisberg, Robert, and Robert Resnick. 1985. "Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas."
- Ferreira, Perobelli Fernando, Azevedo Carlos Antonio, Diniz Dalmolin Simão Ricardo, and Girelli Darian. 2007. "Carbono Orgânico, Óxidos de Ferro E Distribuição de Agregados Em Dois Solos Derivados de Basalto No Rio Grande Do Sul - Brasil." *Ciência Rural* 37 (2): 381–88. Doi:10.1590/S0103-84782007000200013.
- Fonseca, Maria Micaela Leal da. "Tese de doutoramento." *Análise de elementos leves por reacções nucleares com produção de radiação gama*. Lisboa: FCT/UNL, 2010.
- Guerra, M, M Manso, S Longelin, S Pessanha, and M L Carvalho. 2012. "Performance of Three Different Si X-Ray Detectors for Portable XRF Spectrometers in Cultural

Heritage Applications.” *Journal of Instrumentation* 7 (10): C10004–C10004.
Doi:10.1088/1748-0221/7/10/C10004.

Guerra.M, Manso.M, Pessanha.S,Gac.Le.A, Longelin.S,Guilherme.A, Gil.M, Seruya.I.A.,
Carvalho L. M. “X-Ray Fluorescence Spectrometry As A Diagnostic Tool In
Characterization And Conservation Of Manuline Illuminated Manuscripts.” Fct/Unl.

Guimarães, Diana Filipa Carmo. 2007. “Montagem de um espectrómetro de raios x e análise
da concentração de chumbo em amostras biológicas Diana Filipa Carmo Guimarães.”

Green, Rebecca T. “A master's thesis.” *The classification of human bone using x-ray
fluorescence*. Kansas State University, 1885.

Grieken, René E.Van, e Andrzej A. Markowicz. *Handbook of X-Ray Spectrometry: Methods
and Techniques*. United States of America, 2002.

Jesus A.P, Braizinha.B, Ribeiro.P.J. “Excitation function and cross-sections of the reaction
 $^{19}\text{F}(p,p^0c)^{19}\text{F}$.” *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 161-163 (2000)
186-190, 2000.

Jenkins.R. “X-Ray Fluorescence Spectrometry.” John Wiley & Sons: United States of
America, 1999.

Kaabar, W. Et al., 2008. Compositional studies at the Bone-Cartilage interface using PIXE ,
RBS and csaxs techniques. , (November), pp.15–19.

Kang, I.L., 2011. Dependencies of the Attenuation Coefficient on the Frequency and the
Trabecular Thickness in Trabecular-bone-mimicking Phantoms: Application of a
Scattering Model. *Journal of the Korean Physical Society*, 58(5), p.1124.

Kourkoumelis Nikolaos, Balatsoukas Ioannis, Tzaphlidou Margaret. “Ca/P concentration ratio
at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and
energy dispersive X-ray spectroscopy.” *Springer Science+Business Media B.V.*
2011.

Krane.S, Kenneth. “Nuclear reactions.” Em *Introductory nuclear physics*, 392-393. 1988.

Krane.S, Kenneth. “Nuclear reactions.” Em *Introductory nuclear physics*, 424-431. 1988.

Imboden, John, John Stone, and David Hellmann. 2011. *Diagnóstico E Tratamento
Reumatologia Diagnóstico E Tratamento*.

Lindon John, Tranter George, H. J. (2000). Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry,
Part 2 (M-Z). *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 2, 1405.

Lourenço, Filipa Vaz Campos. “A Reacção Nuclear $^{23}\text{Na}(p,p^0\gamma)^{23}\text{Na}$ -Optimização da Linha
de PIGE do Acelerador Tandem de 3 MV da UFA-CTN.” FCT/UNL, 2011.

Markowicz, Andrzej A. “X-ray physics.” Em *Handbook of x-ray spectrometry*, de René E.Van
Grieken, & Andrzej A. Markowicz, 1-92. Vienna, Austria, 2002.

- Martins, Luís de Souto. "Programa para análise em profundidade, dissertação de mestrado." FCT/UNL, 2013.
- Mateus,R, Jesus. P. A, Ribeiro.P.J. "A code for quantitative analysis of light elements." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 229 (2005) 302–308, 2004.
- Pemmer B, Roschger A, Wastl A, Hofstaetter.J.G, Wobrauschek. P, Simon.R, Thaler. H.W, Roschger.P, Klaushofer.K, and Strelia.C. Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. *Bone*. 2013 Nov, e 57(1): 184–193.
- P.M.Endt (Fysisch Laboratorium der Rijksuniversiteit, Utrecht, Netherlands), C.M.Braams (Stichting voor Fundamenteel Onderzoek der Materie, Utrecht, N., 1957. Energy levels of light nuclei (Z=1 to Z=20).II. In *Reviews of Modern Physics*. P. Volume 29, Number 4.
- Pereira, Joaquim Polido. "Doenças reumáticas periarticulares e fibromialgia." Em *Reumatologia fundamental*, de João Eurico Cabral da Fonseca, Helena Canhão, & Mário Viana de Queiroz, 137-163. Lisboa: Lidel, 2013.
- Ramos, Filipa. "Artrite Reumatoide." Em *Reumatologia Fundamental*, de João Eurico Cabral da Fonseca, Helena Canhão, & Mário Viana de Queiroz, 45-51. Lisboa: Lidel, 2013.
- Raucci.G.Maria, Guarino Vincenzo, Ambrosio. Luigi "Biomimetic Strategies for Bone Repair and Regeneration." *Journal of Functional Biomaterials ISSN 2079-4983*, 2012: 688-705.
- Rodrigues, Ana Maria. "Osteoporose e outras doenças ósseas metabólicas." Em *Reumatologia Fundamental*, de João Eurico Cabral da Fonseca, Helena Canhão, & Mário Viana de Queiroz, 125-136. Lisboa: Lidel, 2013.
- Santos.C, Guerra.M, Fonseca.M, Corregidor.V, Alves C L, Silva.H, Costa.A, Martins.L, Luis.H, Carvalho.L.M, Santos.P.J, Branco.C.J, Jesus.P.A. 2015. *Measurement of the ca/p ratio of healthy bone samples by micro-pixe, pige and micro-xrfs*. Iba.
- Seeley.R , Trent D. Stephens.D.Trent, & Philip Tate "Capítulo 6: Sistema esquelético, Ossos e tecido ósseo." Em *Anatomia e Fisiologia*, de Rod, 198-199. Lisboa: Lusociência, 2003.
- Seeley.R, Trent D. Stephens, & Philip Tatr , "Capítulo 6: Sistema esquelético, ossos e tecido ósseo." Em *Anatomia e Fisiologia*, de Rod R, 173-197. Lisboa: Lusociência, 2005.
- Van Grieken, R.E. & Markowicz, a a, 2002. *Handbook of X-ray spectrometry*, Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac800678s>.
- Volfinger.M, e J. L. Robert. "Particle Induced Gamma-Ray Emission Spectrometry Applied To The Determination Of Light Elements In Individual Grains Of Granite Minerals." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 1994: 273-291.
- WF, dejong. "La substance minerale dans les os. Recl Trav Chim Pays ." *Bas Belg*, 1926: 45:445-448.

Zhang, Yuanxun, Feng Cheng, Deyi Li, Yinsong Wang, Guilin Zhang, Wensheng Liao, Tingting Tang, Yuying Huang, and Wei He. 2005. "Investigation of Elementar Content Distribution in Femoral Head Slice with Osteoporosis by SRXRF Microprobe." *Biological Trace Element Research* 103: 177–85. Doi:10.1385/BTER:103:2:177.

Páginas web :

<https://www.s.nist.gov/srmors/certificates/1400.pdf?CFID=33849693&CFTOKEN=4cf9a9883c3dbeab-8A32569A-B5B9-9C88-1036D75792B0AEA0>

<https://www-s.nist.gov/m-srmors/certificates/1486.pdf>

<http://www.bruker.com/products/x-ray-diffraction-and-elementar-analysis/micro-xrf-and-txrf/m4-tornado/technical-details/spot-size.html>

<http://edxrf.if.usp.br/index.php/EDXRF/OEpsilon5>

<http://www.microscopy.info/Content/Press/659.jpg>

<http://www.srim.org>

Anexos

Anexo 1 : Esquema de transições da camada K

IUPAC	M.Siegbah	Configuração Eletrônica		
		n	l	j
	$\alpha_1 \quad \alpha_2 \quad \beta_1 \quad \beta_{1/2} \quad \beta_{3/2} \quad \beta_3 \quad \beta_{5/2} \quad \beta_{7/2} \quad \beta_{9/2} \quad \beta_{11/2} \quad \beta_{13/2}$			
K		1	0	1/2
		2	0	1/2
L ₁		2	1	1/2
L ₂		2	1	3/2
L ₃				
		3	0	1/2
M ₁		3	1	1/2
M ₂		3	1	3/2
M ₃		3	2	3/2
M ₄		3	2	5/2
M ₅				
N ₁		4	0	1/2
N ₂		4	1	1/2
N ₃		4	1	3/2
N ₄		4	2	3/2
N ₅		4	2	5/2
N ₆		4	3	5/2
N ₇		4	3	7/2

Figura 32. Esquema de transições da camada K

Anexo 2: esquema de transições da camada L

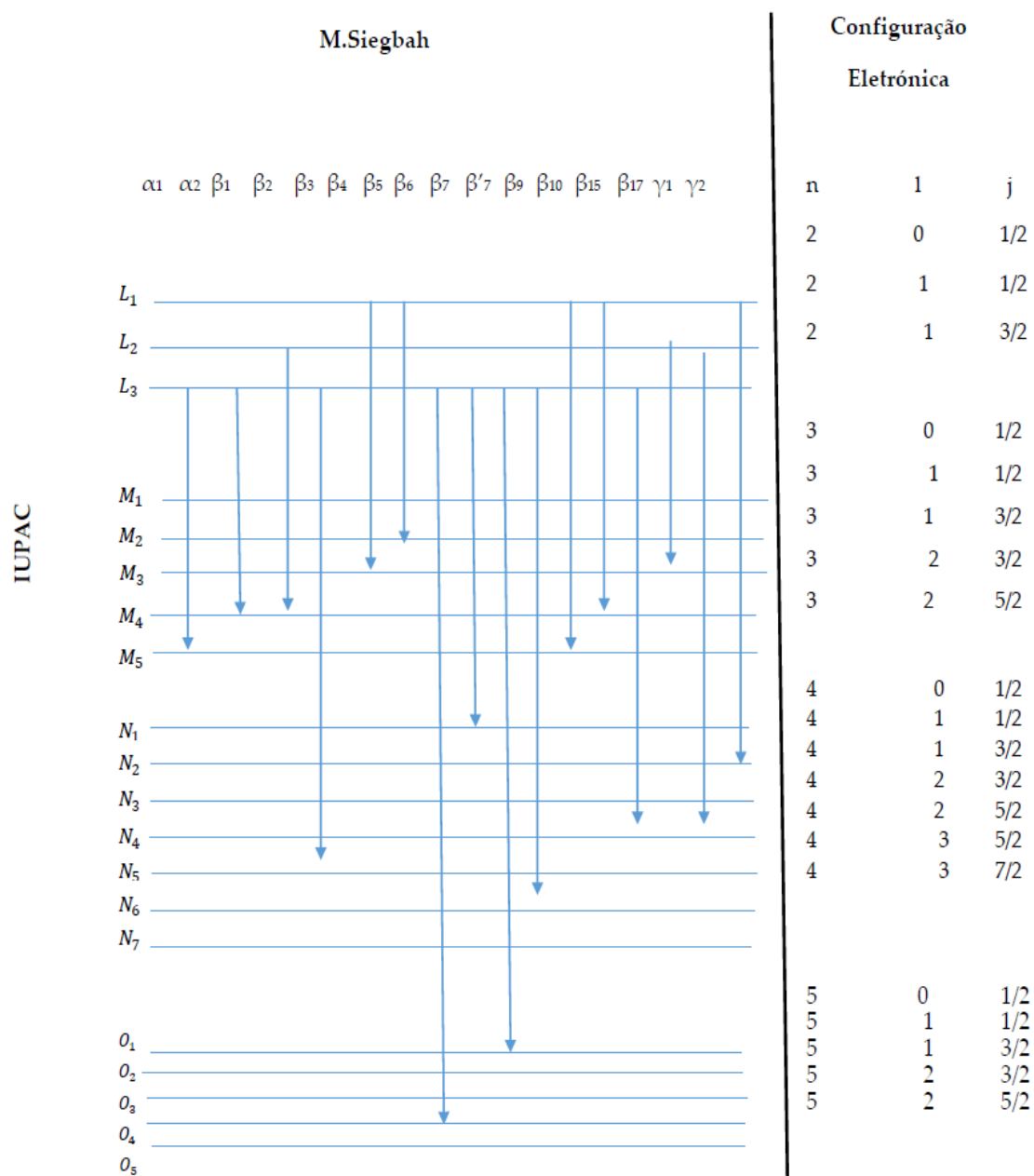


Figura 33. Esquema de transições da camada L

Anexo 3. Diagrama dos estados excitados do ^{31}P

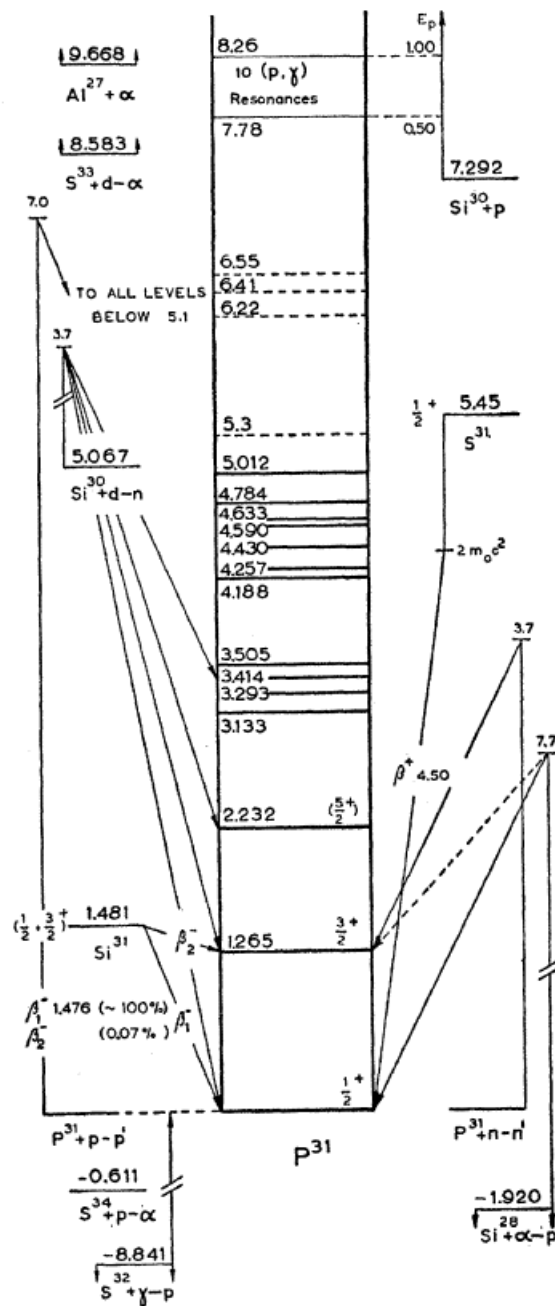


Figura 34. Diagrama completo dos estados excitados de ^{31}P (P.M.Endt, C.M.Braams .1957)

Anexo 4: Gráficos de amostras de osso controle, com osteoporose e bone ash

Amostra controle

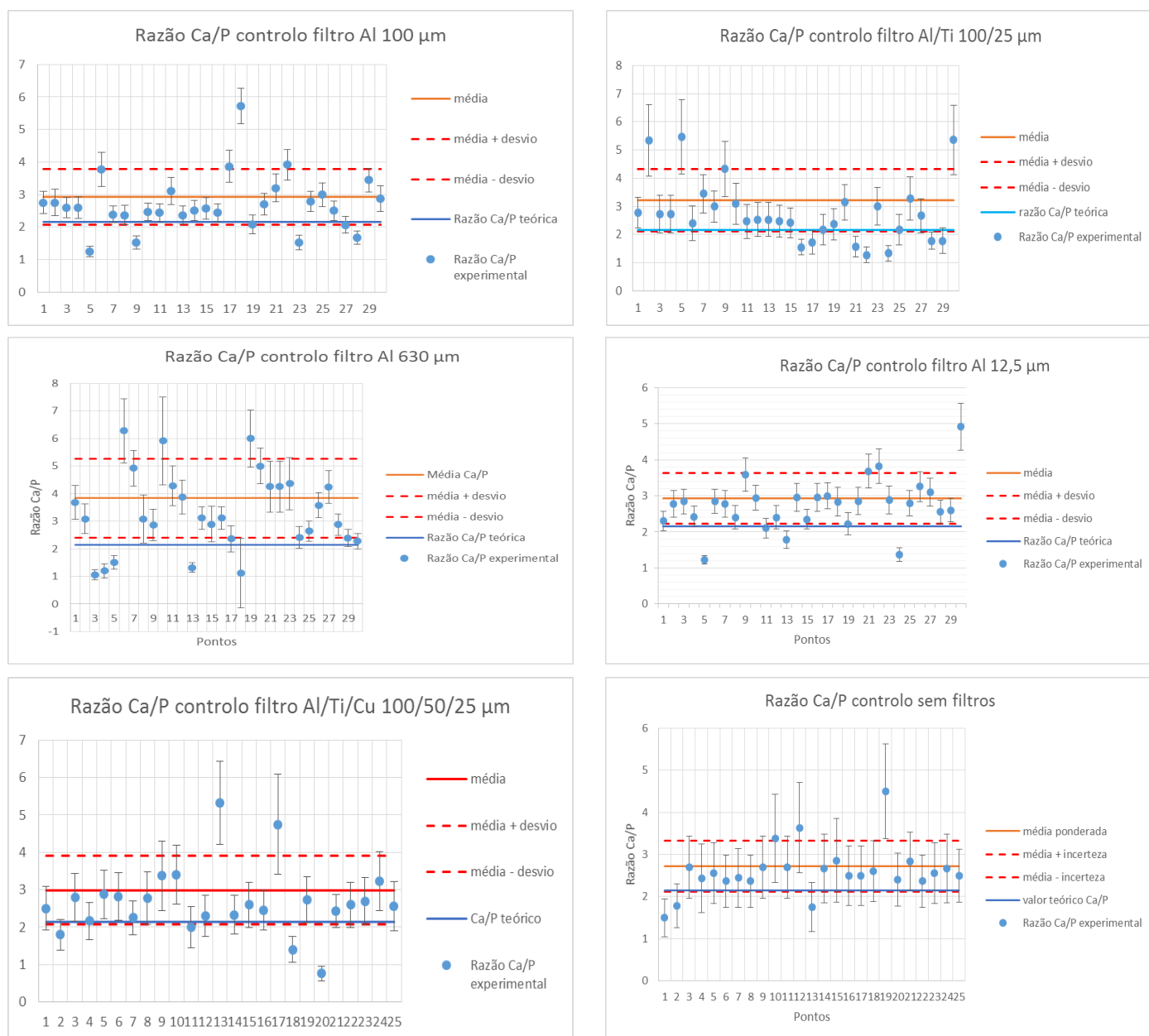


Figura 35. Gráficos da razão Ca/P ao longo dos pontos analisados para amostra controle, a uma tensão de 50 kV, com os diferentes filtros

Amostra osso osteoporótico

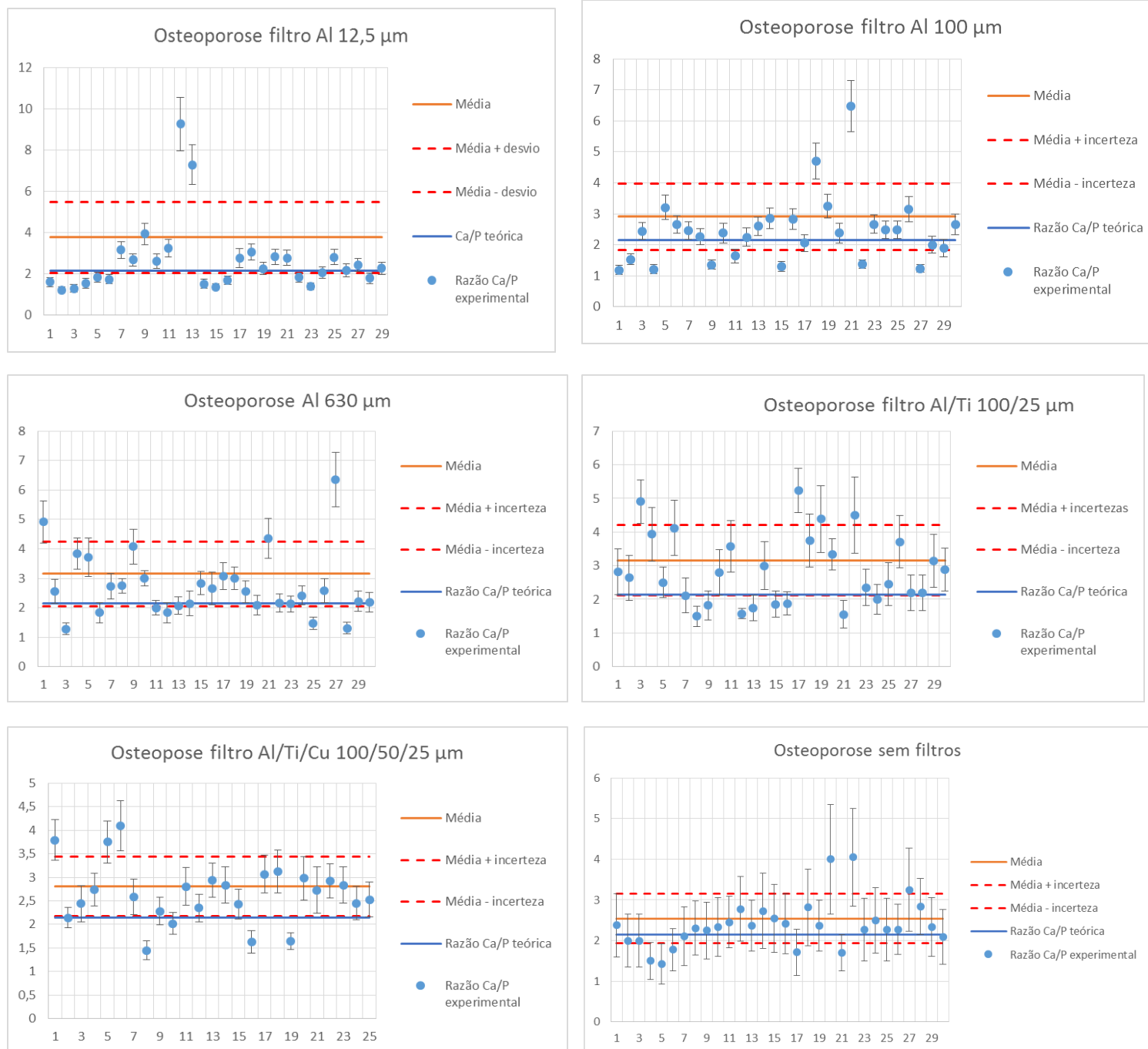


Figura 36. Gráficos da razão Ca/P ao longo dos pontos analisados para amostra de osso com osteoporose, a uma tensão de 50 kV, com os diferentes filtros

Amostra padrão bone ash



Figura 37. Gráficos da razão Ca/P ao longo dos pontos analisados para amostra padrão bone ash, a uma tensão de 50 kV, com os diferentes filtros

Anexo 5: Poster CSI



Analysis of geometric factors in the Ca-P ratio measuring in bones by μ -XRF

A. Costa¹, M. Fonseca¹, C. Santos¹, A. F. Silva¹, M. L. Carvalho¹, J. P. Santos¹, M. Guerra¹

¹ LIBPhys, Dep. Física, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Caparica, Portugal

Introduction

The relative Ca-P content is essential for the maintenance of mineral homeostasis and bone metabolism and therefore it is considered a suitable biomarker for assessing the health of bones [1].

The trabecular bone is a highly porous anisotropic medium comprised of an open celled network, with calcified plaque called trabeculae, filled with bone marrow. [2]

The implication of geometric factors in the study of trabecular bone (or spongy bone), using micro beams, becomes important because the topology of the bone is very different from a usual pellet sample. Thus, the attenuation path of X-rays through the sample is quite diverse from the picture found in the Sherman equation model, resulting in widely variable Ca-P ratios, as is shown in Fig 2.

In this work we have measured this ratio with Micro X-Ray Fluorescence spectroscopy (μ -XRF).

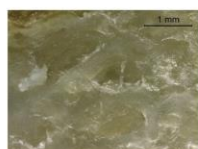


Fig 1. Microscopic image of trabecular bone (control sample)

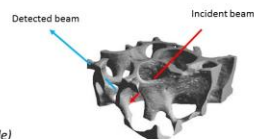


Fig 2. Anomalous attenuation in trabecular bone

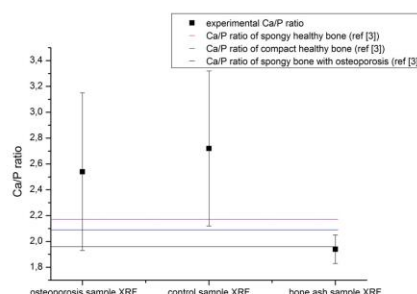


Fig 4. Comparison of Ca/P ratio by μ -XRF

	Ca/P ratio	
	Compact bone [3]	Trabecular bone [3]
Sample of trabecular bone with osteoporosis	—	1,96
Control sample of trabecular bone	—	2,17
Bone ash sample	2,09	*

Table 1. Comparison of Ca/P ratio with literature values

* Bone ash sample is a pellet of compact bone

Experimental conditions

The μ -XRF measurements were performed with Bruker's M4 tornado spectrometer, in FCT/UNL, featuring a beam spot size of 25 μ m, in a vacuum environment with a pressure less than 20 mbar. The voltage used was 50 kV and current of 100 μ A without filters.



Fig 3. Bruker's M4 tornado spectrometer in FCT/UNL

Results

Sample preparation: We have obtained several control and osteoporosis samples derived from human femurs. The samples were cut after hip replacement surgery by removing a cylindrical portion of the femoral head.

Subsequently the samples were cut into 8 pellets with a thickness of approximately 2 mm and a diameter of 1 cm using a diamond saw. They were finally washed with distilled water and placed on the lyophilizer for drying for 24h.

To make the pellet of the reference standard material, bone ash (NIST SRM 1400), we have pressed the powdered sample to 10 ton in a hydraulic press for 1 min to form a pellet of about 1 cm diameter and 2 mm thick.

The samples were placed on a carbon tape and positioned directly under X-ray.

In the μ -XRF analysis, 30 points were obtained for each pellet and the Ca/P ratio was analysed. Finally the weighted averages were calculated and are presented in Fig. 4 and Table 1.

Conclusions

As the photon beam is 25 μ m, at the microscopic level, the sample has grooves or reliefs leading the the beam is focused on the top of the sample, hence no further absorption occurs, but if the beam is focused inside a trabeculae, the emitted beam will suffer attenuation before reaching the detector. As shown, the values of the Ca/P ratio are higher for the normal and osteoporotic bone than for the powder pellet sample (bone ash), a consequence of the sample topology and the fact that P characteristic lines are much more attenuated than the Ca lines. Also, due to the fact that the measuring points were randomly distributed throughout the sample, the final uncertainty is much larger than for a smooth sample such as the bone ash pellet. This makes it impossible to conclude anything about the Ca/P ratio between the control and osteoporotic samples. In order to do so, we are planning on grinding the bone samples and turn them into pressed pellets as well.

References

- [1] N. Kourkoulis, I. Balatsoukas, and M. Tzaphlidou, "Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy," *J. Biol. Phys.*, vol. 38, no. 2, pp. 279–291, 2012.
- [2] Kang, Il Lee. 2011. "Dependencies of the Attenuation Coefficient on the Frequency and the Trabecular Thickness in Trabecular-Bone-Mimicking Phantoms: Application of a Scattering Model." *Journal of the Korean Physical Society* 58 (5): 1124. doi:10.3938/jkps.58.1124.
- [3] Zhang, Yuanxun, Feng Cheng, Deyi Li, Yinsong Wang, Guilin Zhang, Wensheng Liao, Tingting Tang, Yuying Huang, and Wei He. 2005. "Investigation of Elemental Content Distribution in Femoral Head Slice with Osteoporosis by SRXRF Microprobe." *Biological Trace Element Research* 103: 177–85. doi:10.1385/BTER:103:2:177.

Figura 38. Poster apresentado no Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX (CSI 2015), Figueira da Foz, entre 30 de agosto a 3 de setembro

Anexo 6: Mapeamentos

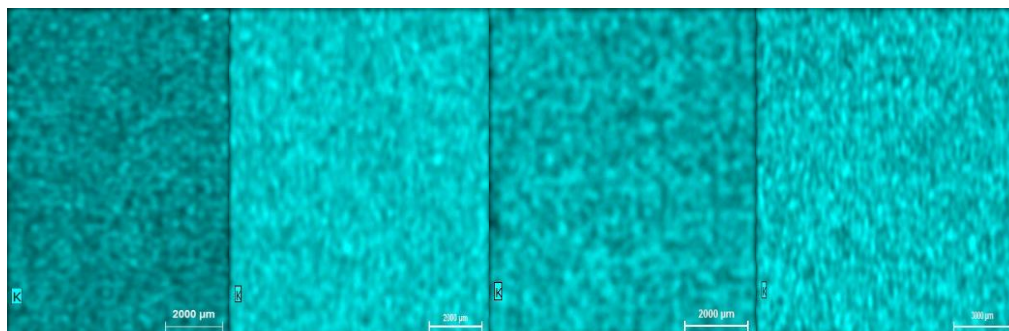


Figura 39. Mapeamento de K das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone

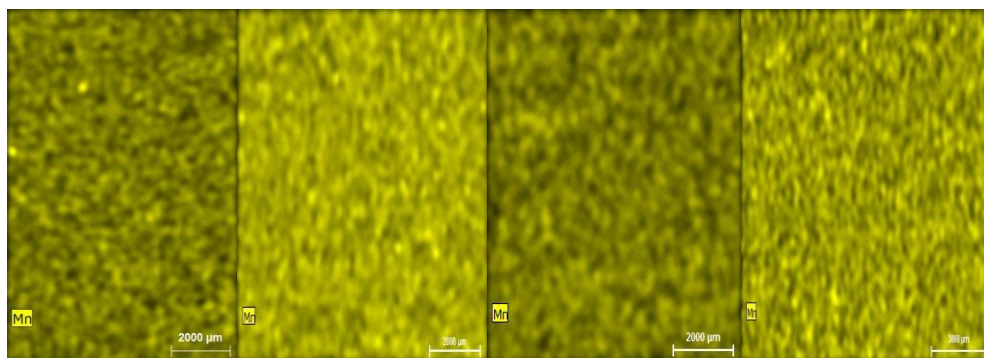


Figura 40. Mapeamento de Mn das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone

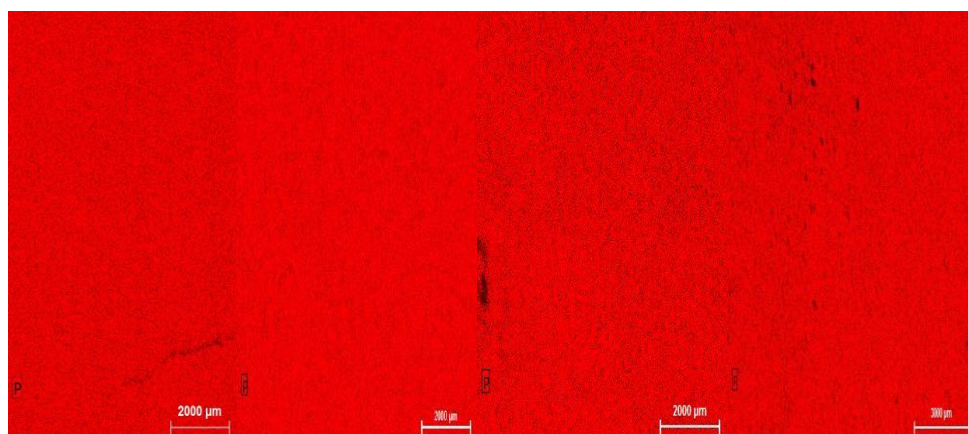


Figura 41. Mapeamento de P das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone

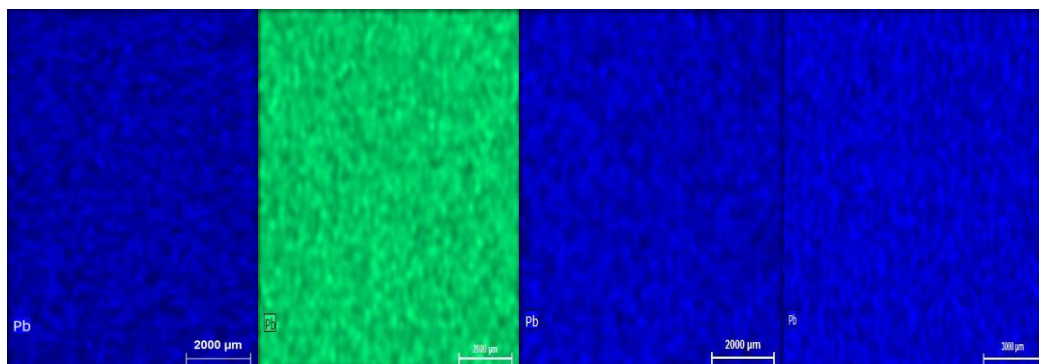


Figura 42. Mapeamento de Pb das amostras padrão da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone

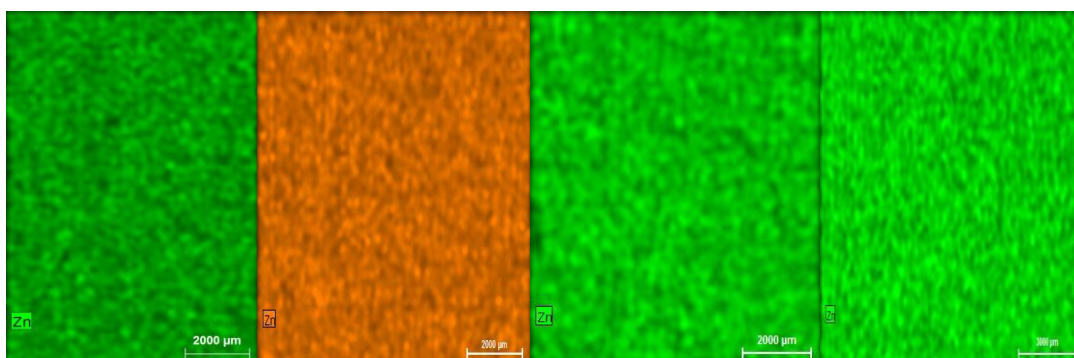


Figura 43. Mapeamento de Zn das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone

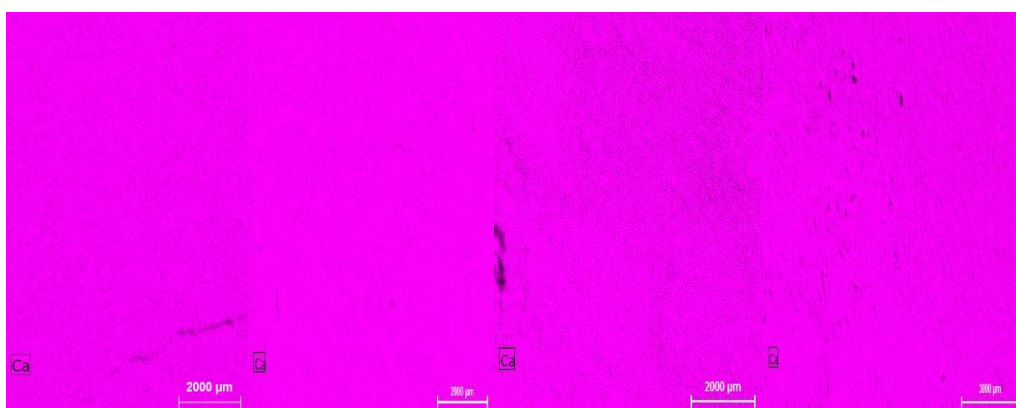


Figura 44. Mapeamento de Ca das amostras padrão, da esquerda para a direita: bone ash, bone meal, bovine bone, caprine bone